



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE SFRP1  
EN LA ONTOGENIA DE LOS  
LINFOCITOS T Y EN LA PATOGENIA  
DE LA LEUCEMIA T LINFOBLÁSTICA  
AGUDA**

TESIS DOCTORAL

**OLGA LANCHO MEDINA**  
MADRID, 2017



Este trabajo ha sido dirigido por la Dra. María Luisa Toribio García y realizado en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", centro mixto perteneciente a la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas y a la Universidad Autónoma de Madrid, con financiación de los proyectos: SAF2010-15106 del Ministerio de Ciencia e Innovación; UE-FP7-HEALTH-2013-INNOVATION-1 de la Unión Europea; SAF2013-44857-R y SAF2014-62233-EXP del Ministerio de Economía y Competitividad, y aecc-20134201 de la Fundación Científica Asociación Española Contra el Cáncer.

Olga Lancho Medina ha sido financiada mediante una beca predoctoral del programa FPI del Ministerio de Ciencia e Innovación asociada al proyecto SAF2010-15106.

El CBMSO recibe una ayuda institucional de la Fundación Ramón Areces.



	<u>Página</u>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>13</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>15</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>1. El proceso de diferenciación de los linfocitos T .....</b>	<b>21</b>
1.1. Estadios madurativos de diferenciación de las células T .....	21
1.2. El microambiente tímico .....	23
<b>2. La vía de señalización de Notch .....</b>	<b>25</b>
2.1. Estructura de los receptores Notch y sus ligandos .....	25
2.2. La vía de señalización de Notch .....	27
2.3. Función y regulación de Notch1 en el desarrollo temprano de los linfocitos T ..	28
2.4. Función y regulación de Notch1 en el desarrollo tardío de los linfocitos T .....	31
<b>3. La vía de señalización de Wnt .....</b>	<b>32</b>
3.1. Vías de señalización de Wnt .....	32
3.2. Función de la vía de Wnt en el desarrollo temprano de los linfocitos T .....	34
3.3. Función de la vía de Wnt en el desarrollo tardío de los linfocitos T .....	35
<b>4. Los factores Sfrps .....</b>	<b>36</b>
4.1. Estructura y función de las proteínas Sfrps .....	36
4.2. Implicación de Sfrp1 en cáncer .....	38
<b>5. La leucemia T linfoblástica aguda .....</b>	<b>39</b>
5.1. Función oncogénica de Notch1 en T-ALL .....	40
5.2. Vías oncogénicas activadas por Notch1 en T-ALL .....	42
5.3. Notch1 como diana terapéutica en el tratamiento de la T-ALL .....	43
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
<b>1. Líneas celulares .....</b>	<b>51</b>
<b>2. Muestras de leucemias primarias .....</b>	<b>51</b>
<b>3. Procesamiento de tejidos, hibridación <i>in situ</i> e inmunohistoquímica ...</b>	<b>52</b>
3.1. Procesamiento de tejidos .....	52
3.2. Hibridación <i>in situ</i> .....	52
3.3. Inmunohistoquímica .....	53

<b>4. Análisis por citometría de flujo .....</b>	<b>54</b>
<b>5. Cultivos organotípicos fetales de ratón (FTOC) .....</b>	<b>55</b>
<b>6. Transducciones lentivirales .....</b>	<b>56</b>
<b>7. Detección de proteínas mediante electroforesis y <i>Western blot</i> .....</b>	<b>57</b>
<b>8. Ensayos de actividad proteolítica de las metaloproteasas ADAM .....</b>	<b>58</b>
<b>9. Animales de experimentación .....</b>	<b>58</b>
9.1. Mantenimiento y genotipado de ratones <i>Sfrp1</i> <sup>-/-</sup> .....	59
9.2. Modelo de xenotrasplante subcutáneo en ratones inmunodeficientes .....	60
9.3. Modelo de xenotrasplante intravenoso en ratones inmunodeficientes .....	60
<b>10. Secuenciación de leucemias primarias T-ALL .....</b>	<b>61</b>
10.1. Secuenciación del receptor <i>NOTCH1</i> : Secuenciación de <i>Sanger</i> .....	61
10.2. <i>Next generation sequencing</i> de <i>SFRP1</i> .....	61
10.3. Secuenciación de ADN metilado .....	61
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>63</b>
<b>1. Relevancia funcional de <i>Sfrp1</i> durante el desarrollo fisiológico de los linfocitos .....</b>	<b>65</b>
1.1. Caracterización de la expresión de <i>Sfrp1</i> y <i>Sfrp2</i> en el timo de ratón: expresión selectiva de <i>Sfrp1</i> .....	65
1.2. <i>Sfrp1</i> regula la activación de <i>Notch1</i> en el timo de ratón .....	67
1.3. <i>Sfrp1</i> regula la diferenciación de los linfocitos T durante el desarrollo intratímico de ratón .....	68
1.3.1. Implicación de <i>Sfrp1</i> en la generación de linfocitos T durante el desarrollo embrionario .....	69
1.3.2. Implicación de <i>Sfrp1</i> en la generación de linfocitos T en la vida postnatal .....	78
<b>2. Relevancia funcional de <i>SFRP1</i> en la fisiopatología de la leucemia T linfoblástica aguda .....</b>	<b>82</b>
2.1. <i>SFRP1</i> regula la activación de <i>NOTCH1</i> en T-ALL .....	82
2.1.1. Efecto de <i>SFRP1</i> sobre la activación de <i>NOTCH1</i> en líneas celulares T-ALL .....	82
2.1.2. Efecto de <i>SFRP1</i> sobre la activación de <i>NOTCH1</i> en leucemias humanas T-ALL primarias .....	87

2.2. SFRP1 inhibe la activación de NOTCH1 mediante la regulación de la actividad de las metaloproteasas ADAM .....	90
2.3. Estudio de la función de SFRP1 en la progresión tumoral de las leucemias T-ALL dependientes de NOTCH1 .....	93
2.3.1. SFRP1 inhibe la proliferación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de líneas celulares T-ALL .....	93
2.3.2. Efecto de SFRP1 en la progresión de leucemias T-ALL primarias .....	97
<b>3. Caracterización de las mutaciones y de la regulación epigenética de <i>SFRP1</i> en la T-ALL .....</b>	<b>101</b>
3.1. Identificación de mutaciones en el gen <i>SFRP1</i> en leucemias primarias de pacientes diagnosticados de T-ALL .....	101
3.2. Identificación de modificaciones epigenéticas en <i>SFRP1</i> en leucemias T-ALL primarias humanas .....	102
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>105</b>
<b>1. Función de Sfrp1 durante el desarrollo fisiológico de los linfocitos T de ratón .....</b>	<b>107</b>
<b>2. Regulación de NOTCH1 por SFRP1 en la fisiopatología de la leucemia T linfoblástica aguda .....</b>	<b>112</b>
<b>3. Implicación de SFRP1 en la patogénesis de la leucemia T linfoblástica aguda .....</b>	<b>115</b>
<b>4. Nuevas perspectivas terapéuticas en el tratamiento de la T-ALL .....</b>	<b>116</b>
<b>5. Modelo propuesto de la función de Sfrp1 durante el desarrollo T y la fisiopatología de la T-ALL .....</b>	<b>117</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>123</b>

## INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.</b> Modelo de diferenciación de las células T en ratón .....	<b>22</b>
<b>Figura 2.</b> Esquema de la diferenciación intratímica de los linfocitos T de ratón .....	<b>24</b>
<b>Figura 3.</b> Estructura de los receptores Notch y sus ligandos .....	<b>26</b>
<b>Figura 4.</b> Vía de señalización de Notch .....	<b>28</b>
<b>Figura 5.</b> Función de Notch1 durante el desarrollo de los linfocitos T .....	<b>29</b>
<b>Figura 6.</b> Vías de señalización de Wnt .....	<b>33</b>
<b>Figura 7.</b> Función de la vía de Wnt durante el desarrollo de los linfocitos T .....	<b>35</b>
<b>Figura 8.</b> Función de los factores Sfrp .....	<b>37</b>
<b>Figura 9.</b> Formas oncogénicas de Notch1 en T-ALL .....	<b>41</b>

## MATERIALES Y MÉTODOS

<b>Tabla 1.</b> Líneas celulares utilizadas en este estudio .....	<b>51</b>
<b>Tabla 2.</b> Anticuerpos utilizados para la detección de antígenos mediante citometría de flujo .....	<b>54</b>
<b>Tabla 3.</b> Anticuerpos utilizados para <i>Western Blot</i> .....	<b>57</b>
<b>Tabla 4.</b> Ratones utilizados durante la experimentación .....	<b>59</b>
<b>Tabla 5.</b> Oligonucleótidos utilizados para el clonaje de <i>SFRP1</i> , el tipaje de los ratones <i>Sfrp1</i> <sup>-/-</sup> y la secuenciación de <i>NOTCH1</i> .....	<b>62</b>

## RESULTADOS

<b>Figura 10.</b> Expresión por hibridación <i>in situ</i> de genes implicados en las vías de Wnt y de Notch en el timo embrionario de ratón .....	<b>66</b>
<b>Figura 11.</b> La proteína Sfrp1 se expresa principalmente en los timocitos de la región SCZ del timo de ratón .....	<b>67</b>
<b>Figura 12.</b> Sfrp1 regula la activación de la vía de Notch1 en el timo de ratón .....	<b>68</b>
<b>Figura 13.</b> La deficiencia de Sfrp1 induce un incremento de las poblaciones DN2, DN3 y CD8ISP en embriones de 15,5 días de gestación .....	<b>70</b>

<b>Figura 14.</b> La ausencia de Sfrp1 incrementa la expresión del IL-7R en los estadios DN2, DN3 y CD8ISP .....	<b>72</b>
<b>Figura 15.</b> La deficiencia de Sfrp1 no incrementa la proliferación de los timocitos de embriones de 15,5 días de gestación .....	<b>73</b>
<b>Figura 16.</b> La deficiencia de Sfrp1 impide la generación de las poblaciones post-selección- $\beta$ CD8ISP y DP en embriones de 16,5 días de gestación .....	<b>75</b>
<b>Figura 17.</b> La ausencia de Sfrp1 incrementa la apoptosis celular en los estadios DN1, DN2, DN3 y CD8ISP .....	<b>76</b>
<b>Figura 18.</b> La deficiencia en Sfrp1 impide la generación de timocitos DP y SP en FTOC de embriones de 15,5 días de gestación .....	<b>77</b>
<b>Figura 19.</b> La deficiencia de Sfrp1 afecta la generación de células DP en ratones neonatos .....	<b>78</b>
<b>Figura 20.</b> La deficiencia de Sfrp1 no afecta a la generación de timocitos maduros en ratones adultos .....	<b>79</b>
<b>Figura 21.</b> Regulación diferencial en función de la edad de la distribución y de la generación de las poblaciones presentes en el timo en ausencia de Sfrp1 .....	<b>81</b>
<b>Figura 22.</b> Generación de sobrenadantes condicionados enriquecidos en SFRP1 .....	<b>83</b>
<b>Figura 23.</b> La presencia de fragmentos portadores del dominio CRD de la proteína SFRP1 impide su función inhibitoria sobre la activación de NOTCH1 .....	<b>84</b>
<b>Figura 24.</b> La inhibición de NOTCH1 es dependiente de la concentración de SFRP1 .....	<b>85</b>
<b>Tabla 6.</b> Estado mutacional de <i>NOTCH1</i> en las líneas celulares utilizadas en este estudio .....	<b>86</b>
<b>Figura 25.</b> SFRP1 reduce los niveles de activación de NOTCH1 en líneas T-ALL con mutaciones en el dominio HD .....	<b>87</b>
<b>Figura 26.</b> Características genéticas y fenotípicas de las leucemias T-ALL primarias seleccionadas .....	<b>88</b>
<b>Figura 27.</b> Expansión <i>in vivo</i> de leucemias T-ALL en ratones inmunodeficientes .....	<b>89</b>

<b>Figura 28.</b> SFRP1 disminuye la activación de NOTCH1 en leucemias primarias T-ALL con mutaciones activadoras de NOTCH1 en el dominio HD dependientes del procesamiento por ADAMs .....	<b>90</b>
<b>Figura 29.</b> SFRP1 disminuye la actividad de las metaloproteasas de la familia ADAM .....	<b>91</b>
<b>Figura 30.</b> SFRP1 disminuye la actividad de las metaloproteasas de la familia ADAM con la misma eficiencia que el inhibidor específico de ADAM10 .....	<b>93</b>
<b>Figura 31.</b> La sobre-expresión de SFRP1 en líneas T-ALL produce la liberación de SFRP1 al medio extracelular .....	<b>94</b>
<b>Figura 32.</b> La expresión ectópica de SFRP1 en líneas T-ALL regula de manera autocrina la activación de NOTCH1 .....	<b>95</b>
<b>Figura 33.</b> La sobre-expresión de SFRP1 reduce la proliferación <i>in vitro</i> de las líneas celulares leucémicas dependientes de NOTCH1 con mutaciones en el dominio HD .....	<b>96</b>
<b>Figura 34.</b> La sobre-expresión de SFRP1 reduce la expansión tumoral <i>in vivo</i> de T-ALLs dependientes de NOTCH1 con mutaciones en el dominio HD .....	<b>97</b>
<b>Figura 35.</b> Xenotrasplante de leucemias primarias de pacientes de T-ALL transducidas con SFRP1 .....	<b>98</b>
<b>Figura 36.</b> La sobre-expresión de SFRP1 no impide la expansión <i>in vivo</i> de leucemias primarias T-ALL en ratones NSG .....	<b>99</b>
<b>Figura 37.</b> La producción autocrina de SFRP1 no es capaz de bloquear la activación de NOTCH1 en leucemias T-ALL <i>in vivo</i> .....	<b>100</b>
<b>Tabla 7.</b> Mutaciones en el gen <i>SFRP1</i> en leucemias primarias de pacientes diagnosticados de T-ALL .....	<b>102</b>
<b>Figura 38.</b> Regulación epigenética del gen <i>SFRP1</i> en leucemias primarias de pacientes diagnosticados de T-ALL .....	<b>103</b>

## DISCUSIÓN

<b>Figura 39.</b> Función de Sfrp1 durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo .....	<b>112</b>
---	------------

<b>Figura 40.</b> Modelo hipotético del papel de Sfrp1 durante la patogénesis y el tratamiento de leucemias T-ALL dependientes de Notch1 .....	<b>118</b>
--	------------

En este trabajo hemos respetado las abreviaturas en inglés de muchos términos para facilitar su lectura junto con otros textos científicos.

- ADAM:** *A Disintegrin And a Metalloprotease*
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ANK:** repeticiones tipo anquirina (*Ankyrin repeats*)
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- bHLH:** *basic Helix Loop Helix*
- BrdU:** bromodesoxiuridina
- CD8 ISP:** CD8 simple positiva inmadura (*Immature Single Positive*)
- CMJ:** unión cortico-medular (*Cortico-Medullary Junction*)
- CRD:** *Cystein Rich Domain*
- CSCs:** célula madre cancerosa (*Cancer Stem Cells*)
- CSL:** *CBF1/RBPjk, Su(H), LAG-1*
- Dkk:** *Dickkopf*
- DN:** doble negativa (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>)
- DOS:** *Delta and OSM-11-like proteins*
- DP:** doble positiva (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)
- DSL:** *Delta-Serrate-Lag2*
- EGF:** factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*)
- ETP:** progenitor T más temprano (*Early Thymic Progenitor*)
- FBS:** suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)
- Fz:** *Frizzled*
- FTOC:** cultivo organotípico de timo fetal (*Fetal Thymic Organ Culture*)
- GSI:** inhibidor de  $\gamma$ -secretasa ( *$\gamma$ -Secretase Inhibitor*)
- HD:** dominio de heterodimerización (*Heterodimerization Domain*)
- HSC:** célula madre hematopoyética (*Hematopoietic Stem Cell*)
- ICN1:** región intracelular de Notch1 (*Intracellular Notch1*)
- IL-7:** interleuquina 7
- IL-7R:** receptor de interleuquina 7
- JME:** *Juxtamembrane Expansion Mutants*
- Jnk:** *Jun N-terminal Kinase*
- KDa:** kilodalton
- ko:** *knock out*
- Lef1:** *Lymphoid Enhancer Binding Factor 1*



**LIC:** célula iniciadora de la leucemia (*Leukemia Initiating Cell*)

**LNR:** repeticiones tipo Lin12-Notch (*Lin Repeats*)

**Lrp:** receptores de lipoproteínas de baja densidad (*Lipoprotein Receptor-related Protein*)

**MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*)

**MO:** médula ósea

**NRR:** región reguladora negativa (*Negative Regulatory Region*)

**NLS:** secuencias de localización nuclear (*Nuclear Localization Sequence*)

**NTR:** *Netrin-Related Motifs*

**PCP:** *Planar Cell Polarity*

**PFA:** paraformaldehído

**PKC:** proteína quinasa C (*Protein Kinase C*)

**PLC:** fosfolipasa C (*Phospholipase C*)

**pTa:** cadena  $\alpha$  del pre-TCR

**RAG:** gen activador de la recombinación (*Recombinase-activating gene*)

**RAM:** módulo de asociación a RBPjk (*RBPjk Association Module*)

**Rock:** *Rho associated Coiled-coil-containing protein Kinase*

**Rhoa:** *Ras Homologue gene-family member A*

**SCZ:** región sub-capsular (*Sub-Capsular Zone*)

**Sfrp:** *Secreted Frizzled-Related Protein*

**SP:** simple positiva (*Simple Positive*)

**SPF:** libre de patógenos específicos (*Specific Pathogen Free*)

**T-ALL:** leucemia linfoblástica aguda T (*T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia*)

**TACE:** *TNF-alpha Converting Enzyme*

**TAD:** dominio de transactivación (*Transactivation Domain*)

**Tcf:** *T-Cell Factor*

**TCR:** receptor de antígeno de células T (*T Cell Receptor*)

**TEC:** célula epitelial del timo (*Thymic Epithelial Cell*)

**TSP:** progenitor que coloniza el timo (*Thymus-Seeding Progenitor*)

**Wif:** factor inhibidor de Wnt (*Wnt Inhibitory Factor*)

**wt:** *wild-type*

Notch1 signaling plays a key role in T-cell lineage commitment and differentiation within the thymus; but deregulation of Notch1 activation gives rise to oncogenic transformation of developing thymocytes leading to T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). Recent studies have shown that Notch1 signaling is negatively modulated in mouse retinal neurogenesis by secreted frizzled-related protein 1 (Sfrp1), a regulator of Wnt signalling that binds to ADAM10 metalloprotease and down-regulates its activity. Given that ADAM10 is required for Notch activation in developing thymocytes, the general aim of this study was to establish whether Sfrp1 regulates Notch1-dependent T-cell development and T-ALL pathogenesis. Loss-of-function approaches using *Sfrp1*<sup>-/-</sup> mutant mice revealed that Sfrp1 regulates thymocyte numbers and differentiation dynamics at two sequential maturation stages placed upstream or immediately after the  $\beta$ -selection check-point. Early in ontogeny (E15.5), *Sfrp1*<sup>-/-</sup> thymuses have increased numbers of thymocyte progenitors, which overexpress IL-7R, a known Notch1 target, but show increased apoptosis and accelerated differentiation. One day later, lack of Sfrp1 markedly compromises rescue from apoptosis and expansion of thymocytes that undergo  $\beta$ -selection, leading to impaired transition of DN progenitors to the DP stage. Notably, the developmental defect of *Sfrp1*<sup>-/-</sup> embryos is overcome in adult mutant mice, which however present a significant loss of the most immature intrathymic progenitors, likely reflecting their accelerated differentiation.

Gain-of-function approaches were then employed to assess whether SFRP1 can play a role in NOTCH1-mediated T-ALL pathogenesis. We found that over-expression of SFRP1 in NOTCH1-dependent human T-ALL cell lines and primary T-ALLs results in decreased NOTCH1 activation and cell proliferation *in vitro*, and also impairs T-ALL engraftment and progression *in vivo*. Supporting a key role of SFRP1 in T-ALL pathogenesis, "next generation sequencing" of coding *SFRP1* exons in primary human T-ALLs, allowed the identification of a *SFRP1* mutation, and epigenetic analyses revealed fifteen *SFRP1* hypermethylated regions, suggesting a tightly epigenetic regulation of *SFRP1* expression in human T-ALL.

Collectively, our study provides evidence that tight regulation of Notch signaling by Sfrp1 plays a key role in T-cell development and T-ALL pathogenesis, and point toward Sfrp1 as a novel therapeutic target for the treatment of Notch-dependent T-ALL.

La señalización a través de Notch1 juega un papel fundamental en la determinación de linaje T y la diferenciación intratímica, pero su desregulación provoca la transformación oncogénica de los timocitos en desarrollo dando lugar a la leucemia T linfoblástica aguda (T-ALL). Estudios recientes han demostrado que la señalización a través de Nocth1 es modulada negativamente durante el proceso de neurogénesis de retina de ratón por Sfrp1, un regulador de la vía de Wnt capaz de unirse a la metaloproteasa ADAM10 e inhibir su actividad. Teniendo en cuenta que la activación de Notch1 depende de ADAM10 en los timocitos en desarrollo, el objetivo general de este estudio fue establecer si Sfrp1 era capaz de regular tanto la diferenciación de las células T como la patogénesis de la T-ALL dependientes de Notch1. Aproximaciones experimentales de pérdida de función utilizando ratones mutantes *Sfrp1*<sup>-/-</sup> revelaron que Sfrp1 regula los números de timocitos y la dinámica de diferenciación durante dos estadios madurativos consecutivos, antes e inmediatamente después de la selección-β. En etapas tempranas de la ontogenia (E15,5), los timos *Sfrp1*<sup>-/-</sup> presentan un incremento en los números de timocitos, que sobre-expresan el IL-7R, una conocida diana de Notch1, pero además presentan un incremento en la apoptosis y una diferenciación acelerada. Un día después, la pérdida de Sfrp1 impide el resacate de la apoptosis y la expansión de los timocitos que han superado la selección-β, provocando un bloqueo en la transición de los progenitores DN al estadio DP. Sin embargo, el defecto en el desarrollo de los embriones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> es superado en los ratones adultos, que aún así presentan una pérdida significativa de los progenitores intratímicos más inmaduros, reflejando su diferenciación acelerada.

Aproximaciones de ganancia de función fueron empleadas para estudiar el papel de SFRP1 en la patogénesis de la T-ALL mediada por NOTCH1. Nuestros resultados mostraron que la sobre-expresión de SFRP1 en líneas celulares humanas T-ALL dependientes de NOTCH1 y en T-ALLs primarias resulta en una disminución en la activación de NOTCH1 y en la proliferación celular *in vitro*, además de impedir la progresión tumoral *in vivo*. Apoyando el papel de SFRP1 durante la patogénesis de la T-ALL, "next generation sequencing" de los exones codificantes de *SFRP1*, nos permitió identificar una mutación en *SFRP1*, y análisis epigenéticos revelaron quince regiones hipermetiladas en *SFRP1*, sugiriendo que existe una regulación epigenética de la expresión de *SFRP1* en la T-ALL humana.

En resumen, nuestro estudio aporta evidencias de que la estrecha regulación de la señalización de Notch por Sfrp1 juega un papel esencial durante el desarrollo de los linfocitos T y en la patogénesis de la T-ALL, posicionando a Sfrp1 como una prometedora diana terapéutica para el tratamiento de la T-ALL dependiente de Notch.

# INTRODUCCIÓN

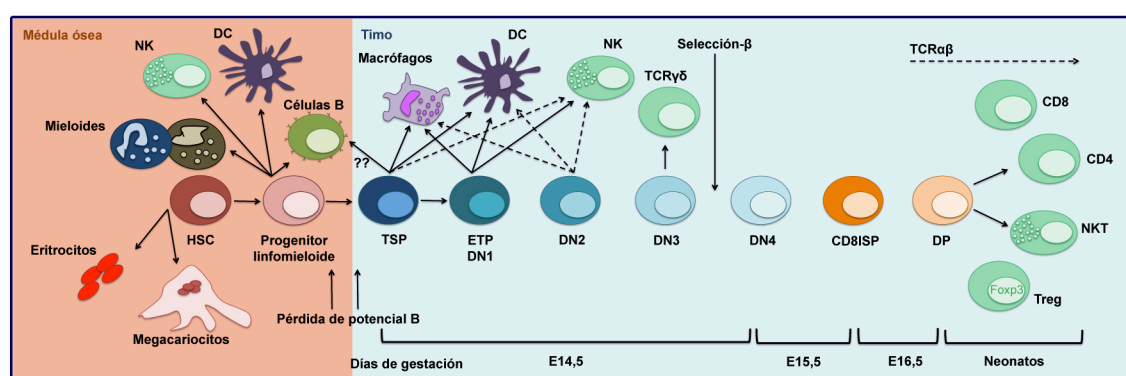
## 1. El proceso de diferenciación de los linfocitos T.

El sistema inmunitario se origina a partir de las células madre hematopoyéticas o HSCs (del inglés, *Hematopoietic Stem Cells*). Las HSCs dan lugar a poblaciones de progenitores intermediarios que cada vez tienen una capacidad más limitada de diferenciación debido a la activación de programas transcripcionales específicos, dando lugar finalmente a todos los linajes de células hematopoyéticas presentes en los individuos. Mientras que la mayoría de los linajes hematopoyéticos (mieloides, eritroides y linfocitos B) maduran en la médula ósea (MO), la diferenciación de los linfocitos T tiene lugar en un órgano especializado, el timo. El timo recibe un flujo continuo de progenitores que viajan a través de la circulación sanguínea procedentes de la MO, que irán dando lugar a los distintos estadios madurativos del desarrollo T, hasta la generación de células T maduras y funcionales, que una vez completada su maduración volverán a la circulación sanguínea (Bhandoola *et al.*, 2007; Ciofani y Zúñiga-Pflücker, 2007; Weerkamp *et al.*, 2006a). Una vez en la periferia, las células T intervienen en la inmunidad celular, eliminando células infectadas y cancerosas, activando otras células inmunes y generando las células T memoria. Para que el proceso de generación de las células T tenga lugar, es necesario que el timo proporcione el nicho capaz de soportar la diferenciación de estos progenitores. Este nicho está constituido principalmente por células epiteliales o TECs (del inglés, *Thymic Epithelial Cells*), que expresan proteínas tanto de membrana como solubles, esenciales para la diferenciación de los progenitores que llegan al timo. Entre estas proteínas se encuentran los receptores de la familia Notch (Pui *et al.*, 1999; Radtke *et al.*, 1999), el receptor de interleuquina 7 (IL-7R) (Shortman *et al.*, 1990) y factores de la vía de Wnt (Weerkamp *et al.*, 2006b).

### 1.1. Estadios madurativos de la diferenciación de las células T

La maduración de las células T ocurre en el timo a través una serie controlada de estadios madurativos, que comienza con la llegada de los precursores desde la MO. Debido al poco tiempo que esta población permanece en la circulación sanguínea y a su baja frecuencia, su identidad ha sido difícil de definir (Bhandoola *et al.*, 2007; Foss *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2001). El progenitor más temprano que llega al timo o TSP (del inglés, *Thymus-Seeding Progenitor*) tiene el fenotipo Lin<sup>-</sup> c-kit<sup>+</sup> Flt3<sup>+</sup> CCR9<sup>+</sup> IL-7R<sup>-/lo</sup> CD24<sup>-/lo</sup> (Allman *et al.*, 2003; Porritt *et al.*, 2004; Sambandam *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2005); que una vez en el timo, tras recibir la señal de Notch1, da lugar al progenitor

inmaduro temprano o ETP (del inglés, *Early Thymic Progenitor*) (Tan *et al.*, 2005) (**Figura 1**). La generación secuencial de las poblaciones del timo a partir de los TSP se ha caracterizado por la expresión de las moléculas CD4 y CD8, que correlaciona con su nivel de madurez. Los timocitos más inmaduros carecen de la expresión de ambas moléculas, por lo que se les denomina células doble negativas (DN). En ratón, la población de células DN se subdivide en cuatro poblaciones según la expresión de los marcadores de superficie CD44 y CD25: CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (DN1), CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (DN2), CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> (DN3) y CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> (DN4) (Godfrey *et al.*, 1993) (**Figura 2**). La población DN1 es una población heterogénea que puede dar lugar a distintos tipos celulares: células T  $\alpha\beta$ , células T  $\gamma\delta$ , células NK, células dendríticas, macrófagos y células B (revisado en Ciofani and Zúñiga-Pflücker, 2007) (**Figura 1**).



**Figura 1. Modelo de diferenciación de las células T en ratón.**

La caracterización de las células DN1 permitió diferenciar cinco subpoblaciones en base a la expresión de los marcadores ckit y CD24 (DN1<sub>a-e</sub>), revelando que las subpoblaciones DN1<sub>a</sub> y DN1<sub>b</sub> son las más eficientes en la generación de células T, debido a que los progenitores ETPs se encuentran dentro de estas subpoblaciones DN1 positivas para ckit (Porritt *et al.*, 2004). A continuación, en la población de células DN2, que aún posee la capacidad de generar células NK, macrófagos y células dendríticas (Bell and Bhandoola, 2008) (**Figura 1**), los genes *Rag1* y *Rag2* (del inglés, *Recombinase-activating gene*) median los reordenamientos de los genes *Tcrβ*, *Tcrγ*, y *Tcrδ*, que codifican para las cadenas β, γ y δ del receptor de antígeno de las células T o TCR (del inglés, *T Cell Receptor*) (Burtrum *et al.*, 1996), respectivamente. El compromiso completo hacia el linaje T ocurre después de la transición de DN2 a DN3. En DN3, las células con reordenamientos correctos en TCRγ y TCRδ se diferencian a células γδ (Passoni *et al.*, 1997) (**Figura 1**). Por otro lado, los timocitos que han

reordenado correctamente la cadena  $\beta$  del TCR sufren el proceso de selección- $\beta$  (Hoffman *et al.*, 1996), mediado por el complejo preTCR, en el cual la cadena  $\beta$  del TCR se asocia a una cadena invariante pre-TCR $\alpha$  (pT $\alpha$ ). La selección- $\beta$  induce la expansión de los timocitos DN3 en los que podemos encontrar dos subpoblaciones: una población previa a la selección- $\beta$  con niveles bajos del receptor CD27, denominada DN3<sub>a</sub>; y una segunda población, DN3<sub>b</sub>, que ya ha sufrido la selección- $\beta$  y posee niveles altos del receptor CD27 (Taghon *et al.*, 2006). Tras esta selección, sólo los timocitos con un TCR $\beta$  funcional comenzarán los reordenamientos del gen *Tcra*, para continuar el proceso madurativo hacia el linaje  $\alpha\beta$  (von Boehmer *et al.*, 1998). El proceso de selección- $\beta$  provoca la disminución de los niveles de CD25 y del pre-TCR, dando lugar a la aparición de la población DN4. Esta población expresará la molécula CD8 para generar la población CD8 ISP (del inglés, *Immature Single Positive*), siendo un estadio transitorio que acabará dando lugar a las células dobles positivas (DP), al expresar también la molécula CD4 (MacDonald *et al.*, 1998).

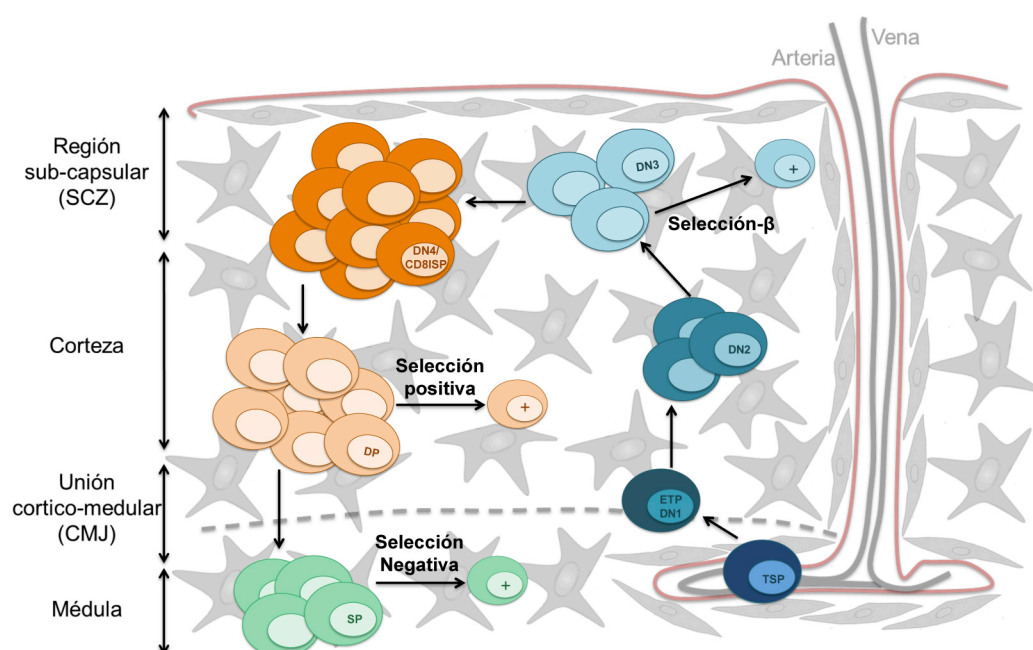
Las células DP que finalmente expresan un TCR $\alpha\beta$  maduro en la membrana, sufren los procesos de selección positiva y negativa. Durante la selección positiva se asegura la generación de células T con receptores TCR $\alpha\beta$  distribuidos de forma clonal, capaces de reconocer cualquier péptido antigénico presentado por moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad o MHC (del inglés, *Major Histocompatibility Complex*). A continuación, durante el proceso de selección negativa, se produce la eliminación de timocitos auto-reactivos que reconocen antígenos propios (Amsen and Kruisbeek, 1998). Una vez finalizadas ambas selecciones, los timocitos completan su diferenciación hacia células T maduras simples positivas o SP (del inglés, *Simple Positive*) CD4<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$  o CD8<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ , además de adquirir moléculas que permiten su salida a la periferia.

## 1.2. El microambiente tímico

El timo aporta un ambiente óptimo para la diferenciación de las células de linaje T, de forma que la interacción del estroma tímico con los progenitores genera señales que promueven la diferenciación, proliferación y migración de los timocitos (**Figura 2**). El timo está dividido en dos regiones histológicamente definidas, la médula y la corteza, separadas por la unión cortico-medular o CMJ (del inglés, *Cortico-Medullary Junction*). Además, en la parte más distal de la corteza se encuentra la región sub-capsular o SCZ



(del inglés, *Sub-Capsular Zone*) (**Figura 2**). Los diferentes subtipos de TECs de la médula y de la corteza aportan los factores para crear microambientes concretos, permitiendo que los timocitos en distintos estadios madurativos ocupen distintas regiones del timo. Los progenitores TSP acceden al timo a través de los vasos sanguíneos situados en la CMJ, migrando durante los estadios DN1 y DN2 a través de la corteza hasta la SCZ, región en la que se produce la selección- $\beta$  en el estadio DN3. Posteriormente, los timocitos DN4, CD8ISP y DP migran a través de la corteza y, tras la selección positiva, los timocitos SP se adentran en la médula, donde ocurre la selección negativa (Ciofani and Zúñiga-Pflücker, 2007). Por tanto, las TECs corticales proporcionan el nicho necesario para la especificación de linaje y la diferenciación de los progenitores, además de tener un papel fundamental durante la selección- $\beta$  y la selección positiva. Sin embargo, las TECs medulares son esenciales para una correcta selección negativa durante los últimos estadios del desarrollo T (revisado en Ciofani and Zúñiga-Pflücker, 2007) (**Figura 2**). Entre las moléculas responsables de la generación de estos microambientes fundamentales para la diferenciación de los linfocitos T son esenciales las moléculas de las vías de Notch y de Wnt.



**Figura 2. Esquema de la diferenciación intratímica de los linfocitos T de ratón.**

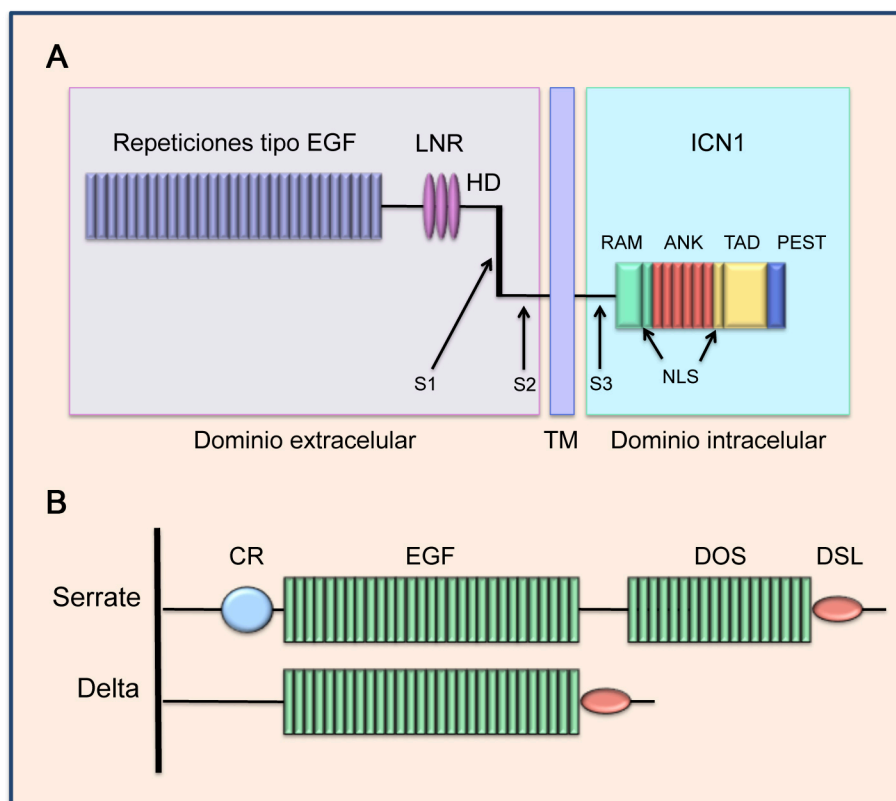
## 2. La vía de señalización de Notch

La vía de señalización de Notch es una vía altamente conservada durante la evolución, jugando un papel muy importante en la regulación de procesos celulares como la proliferación, apoptosis y especificación de linaje en diversos sistemas, entre los que se encuentra el hematopoyético. Durante la hematopoyesis, la señalización por Notch es esencial para el desarrollo de los linfocitos T, induciendo un programa específico de maduración en los progenitores que llegan al timo procedentes de la MO.

### 2.1. Estructura de los receptores Notch y sus ligandos

Los receptores Notch son una familia de proteínas transmembrana altamente conservada (Artavanis-Tsakonas, 1999) (**Figura 3**), constituida por cuatro miembros (Notch1-4) en mamíferos. Los receptores Notch son sintetizados como proteínas precursoras de 300 KDa que son glicosiladas en el retículo endoplasmático. Durante el tránsito a la membrana, a través de la red *trans* Golgi, las proteínas precursoras sufren un corte proteolítico en el sitio de corte S1 (**Figura 3**), mediado por una proteasa tipo furina. Los fragmentos resultantes se unen de forma no covalente formando un receptor maduro heterodimérico, que es transportado a la membrana plasmática (Blaumueller *et al.*, 1997). El dominio extracelular está formado por 29-36 repeticiones de tipo factor de crecimiento epidérmico o EGF (del inglés, *Epidermal Growth Factor*), algunas de las cuales median las interacciones con los ligandos de Notch. A continuación, se encuentra una región reguladora negativa o NRR (del inglés, *Negative Regulatory Region*), compuesta por 3 repeticiones tipo Lin12-Notch o LNR (del inglés, *Lin Repeats*) y un dominio de heterodimerización o HD (del inglés, *Heterodimerization Domain*); responsable de mantener el receptor de manera inactiva en ausencia de ligando. La región intracelular de Notch, denominada ICN1 (del inglés, *Intracellular Notch1*), contiene repeticiones tipo RAM (del inglés, *RBPjk Association Module*), requeridas para la interacción con el factor de transcripción RBPjk o CSL (CBF1/ RBPjk en mamíferos, Su(H) en *Drosophila* y LAG-1 en *C. elegans*); dos secuencias de localización nuclear o NLS (del inglés, *Nuclear Localization Sequence*); varias repeticiones tipo anquirina (ANK), asociadas con los coactivadores de la familia *Mastermind* (MAML1-3), necesarios para la activación de Notch; y un dominio de transactivación o TAD (del inglés, *Transactivation Domain*), donde se encuentra la secuencia PEST (revisado en Kopan and Ilagan, 2009). La secuencia PEST se encarga de regular la estabilidad de la

proteína, llevada a cabo por la ubiquitín ligasa Fbw7, responsable de la degradación de Notch dependiente del proteasoma, y por lo tanto de finalizar la señalización (Oberg *et al.*, 2001).



**Figura 3. Estructura de los receptores Notch y sus ligandos.**

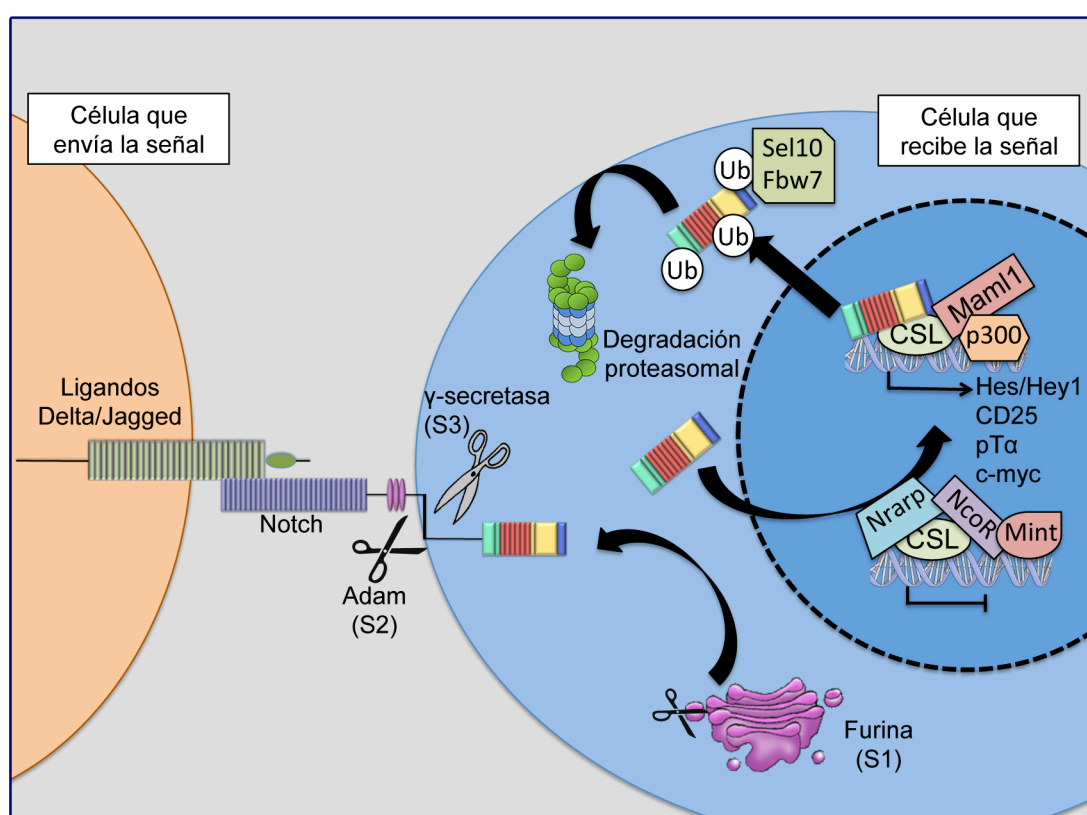
En mamíferos, los receptores Notch son capaces de reconocer cinco ligandos expresados en la superficie de las células vecinas, tres de la familia Delta (DL1, DL3 y DL4) y dos de la familia Serrate (Jag1 y Jag2) (revisado en D'Souza *et al.*, 2008) (**Figura 3B**). Estos receptores se caracterizan por ser proteínas transmembrana con un motivo DSL en el extremo N-terminal (del inglés, *Delta-Serrate-Lag2*), un dominio formado por repeticiones EGF llamado DOS (del inglés, *Delta and OSM-11-like proteins*) y un dominio de repeticiones tipo EGF (revisado en Kopan and Ilagan, 2009). Los ligandos de las familias Serrate y Delta se diferencian por la presencia o ausencia de un dominio rico en cisteínas y del dominio DOS, respectivamente. Las glicosil-transferasas de la familia Fringe pueden modular la afinidad de los receptores Notch por sus ligandos (Brückner *et al.*, 2000). De hecho, tanto los ligandos como los receptores de Notch presentan distintas funciones *in vivo*. En concreto, se ha demostrado que DL4 es el mediador de la señal fisiológica de Notch1 necesaria para la especificación de linaje T (Besseyrias *et*

*et al.*, 2007). Sin embargo, la interacción entre Notch2 y Dll1 es esencial para el desarrollo de las células B (Hozumi *et al.*, 2004). Por este motivo, no es extraño que exista una expresión diferencial de los distintos ligandos de Notch en las distintas localizaciones intratímicas, siendo muy importante para el mantenimiento de los distintos microambientes presentes en el timo. Datos de nuestro laboratorio, junto con otros grupos, han ayudado a establecer la distribución de los ligandos de Notch en el timo, de forma que DL4 se expresan en la corteza del timo de ratón (Hozumi *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2008; Schmitt *et al.*, 2004 García-León *et al.*, en preparación), área donde tiene lugar la diferenciación de los timocitos DN. Sin embargo, la expresión de DL1 parece confinada a los vasos sanguíneos (Hozumi *et al.*, 2008). Por otro lado, el ligando Jag1 se expresa en la médula y la expresión de Jag2 es mayoritaria en la corteza (García-León *et al.*, en preparación). Finalmente, nuestro grupo ha demostrado que la expresión de los ligandos de Notch se regula durante la ontogenia, lo que implica una función diferencial de la vía de Notch a lo largo del desarrollo y de la vida post-natal del individuo (García-León *et al.*, en preparación).

## 2.2. La vía de señalización de Notch

La interacción de Notch con su ligando provoca un cambio conformacional en el receptor exponiendo el sitio de corte S2 (**Figura 3**) a las metaloproteasas de la familia Adam (del inglés, *A Disintegrin And a Metalloprotease*), específicamente Adam10 (Kuzbanian) (van Tetering *et al.*, 2009) y Adam17 o TACE (del inglés, *TNF- $\alpha$  Converting Enzyme*) (Brou *et al.*, 2000). Este corte mediado por las Adams cerca de la región transmembrana, da lugar a una forma del receptor anclada a la membrana que carece de dominio extracelular. Este receptor es susceptible de un nuevo corte proteolítico en el sitio S3 (**Figura 3**), mediado por un complejo con actividad  $\gamma$ -secretasa, formado por las enzimas presenilina, nicastrina, APh-1, y PEN-2. Como resultado, se libera al citoplasma la porción intracelular de Notch1 (ICN1), traslocándose al núcleo y uniéndose al factor de transcripción CSL/RBPjk. ICN1 unido a CSL desplaza correpressores como Nrarp, SMRT/NcoR y SHARP/MINT/SPEN, permitiendo el reclutamiento de coactivadores como p300/CBP y MAML-1-3 para iniciar la transcripción de los genes diana (revisado en Kopan and Ilagan, 2009) (**Figura 4**). Las principales dianas de Notch son represores transcripcionales de la familia bHLH (del inglés, *basic Helix Loop Helix*) como Hes y Hey (Jarriault *et al.*, 1995), genes implicados en proliferación y supervivencia como c-myc (Weng *et al.*, 2006), ciclina D1 (Ronchini and

Capobianco, 2001) y p21/Waf (Rangarajan *et al.*, 2001). Además, Notch1 también regula la expresión de genes asociados a la diferenciación de las células T, como CD25 (Adler *et al.*, 2003) y pTα (Reizis and Leder, 2002). Finalmente, nuestro grupo demostró recientemente que Notch1 regula la expresión del IL-7R en el desarrollo intratímico humano (González-García *et al.*, 2009) y de ratón (Mosquera *et al.*, en preparación), a través del gen que codifica para la subunidad IL-7Rα. Posteriores estudios han demostrado la existencia de un *super-enhancer* de Notch1 en varios de estos genes como *c-myc* y *Il7r* (Wang *et al.*, 2011) y en la molécula de adhesión CD44 (García-Peydró *et al.*, en revisión).

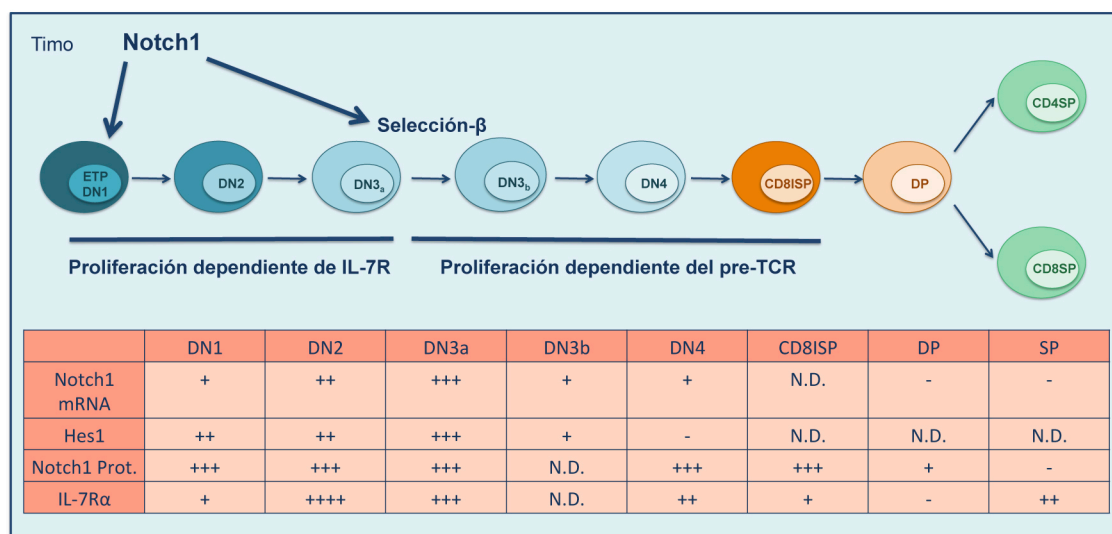


**Figura 4. Vía de señalización de Notch.**

### 2.3. Función y regulación de Notch1 en el desarrollo temprano de los linfocitos T

Las funciones de Notch1 durante el desarrollo intratímico de los linfocitos T consisten en la especificación de linaje y la maduración de los linfocitos T (**Figura 5**). La importancia de Notch1 durante la especificación de linaje T se demostró mediante múltiples experimentos tanto de pérdida como de ganancia de función. Los primeros estudios demostraron que la inactivación inducible de Notch1 o de CSL/RBPjk daba

lugar a un bloqueo en la diferenciación T, generando la acumulación ectópica de células B en el timo (Radtko *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2001). Estos resultados fueron inicialmente interpretados como una instrucción hacia linaje T, con respecto al linaje B, de los progenitores intratímicos más tempranos mediada por la señalización a través de Notch1. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que Notch1 era capaz de inhibir múltiples linajes hematopoyéticos como el mieloide, células B, células NK y células dendríticas, tanto plasmacitoides como convencionales; asegurando de esta manera la especificación de linaje T (Bell and Bhandoola, 2008; De Smedt *et al.*, 2002; Feyerabend *et al.*, 2009; Garcia-Peydro *et al.*, 2006; Rothenberg, 2007; Wada *et al.*, 2008). El estudio de ganancia de función mediante la sobreexpresión de ICN1 en progenitores de MO, resultó en un desarrollo ectópico de células T en la MO a expensas de las células de linaje B y mieloide, generando una población T aberrante DP TCR $\alpha\beta$  (Pui *et al.*, 1999). Con estos datos se demostró que la señalización de Notch1 en los progenitores instruye la especificación de linaje T, debido a la inducción de manera directa de la expresión de genes específicos de linaje como *cd25*, *pTa* y *Il7r*, además de genes no específicos de linaje, como *Hes1* (De Obaldia *et al.*, 2013).



**Figura 5. Función de Notch1 durante el desarrollo de los linfocitos T.**

Notch1 también es importante en momentos posteriores al proceso instructivo de especificación de linaje T, requiriéndose en la transición DN1-DN3, así como durante el proceso de selección- $\beta$ . La generación de células T  $\alpha\beta$  requiere una señalización continuada a través de Notch1 en el estadio DN3, momento en el que se expresa el pre-TCR y se produce la selección- $\beta$  (Wolfer *et al.*, 2002); lo que sugiere que la

cooperación del pre-TCR y de Notch1 es necesaria para que este proceso pueda darse de manera correcta (Ciofani *et al.*, 2006). De hecho, experimentos *in vivo* consistentes en la sobre-expresión de una isoforma dominante negativa del coactivador transcripcional de la ruta de Notch MAML-1 (dnMAML-1) en timocitos inmaduros, demuestran que el requerimiento de Notch1 es absoluto durante el proceso de selección- $\beta$  y no puede rescatarse por la sobre-expresión de *Tcr $\beta$*  o *Tcra $\beta$*  (Maillard *et al.*, 2006). Asimismo, los timocitos deficientes en *Rag2* (que no pueden expresar un pre-TCR), no pueden progresar hacia el estadio DP aunque reciban señalización a través de Notch1 (Allman *et al.*, 2001). Por lo tanto, estos estudios demostraron que el proceso de selección- $\beta$  requiere la señalización simultánea a través de Notch y el pre-TCR.

Todos estos antecedentes que pusieron de manifiesto el papel crucial de Notch en la especificación del linaje T condujeron al estudio detallado de regulación de la expresión de Notch1 durante la diferenciación T. La expresión de Notch1 incrementa de forma progresiva desde los progenitores más tempranos hasta antes de la selección- $\beta$  (Ciofani *et al.*, 2006). En el momento a partir del cual los timocitos han superado el proceso de selección- $\beta$ , y por tanto han pasado al estadio DN3<sub>b</sub>, los niveles de Notch1 disminuyen drásticamente, manteniéndose bajos durante los siguientes estadios madurativos: DN4, DP, SP (González-García *et al.*, 2009; Taghon *et al.*, 2006; Yashiro-Ohtani *et al.*, 2009). La disminución de los niveles de Notch1 está mediada por el factor de transcripción Id3, inducido por el pre-TCR, de forma que Id3 es capaz de inhibir E2A, provocando una disminución del mRNA de Notch1. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales, tanto la transcripción de Notch1 como sobre todo, la activación de los genes diana de Notch1, disminuyen tan rápidamente, son todavía objeto de estudio, debido a que aún en los estadios DN4 y CD8ISP existen niveles altos de expresión del receptor Notch1 en la membrana celular (Fiorini *et al.*, 2009). Una de las hipótesis para explicar este fenómeno apunta a que *Ikaros* impide la capacidad de transcripción de Hes1 en timocitos DN4, disminuyendo de esta forma la expresión de genes diana de Notch1 (Kleinmann *et al.*, 2008). Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para dilucidar estos mecanismos de inhibición de Notch1.

Finalmente, trabajos de nuestro laboratorio realizados a partir de células humanas, han demostrado que Notch1 es esencial para la proliferación de los progenitores intratímicos durante el proceso de diferenciación. La relación funcional entre Notch1 y la vía del IL-7R se observó inicialmente en estudios funcionales *in vitro*,



debido a que la sobreexpresión de ICN1 en progenitores intratímicos ETP producía una gran capacidad proliferativa dependiente de IL-7 (García-Peydró *et al.*, 2006). Trabajos posteriores demostraron la asociación molecular de Notch y del IL-7R al encontrar un sitio de unión de CSL en el promotor del gen *IL7R*; por lo tanto, la transcripción del gen que codifica para la cadena IL-7R $\alpha$  del IL-7R está regulada por Notch1 durante el proceso de diferenciación T tanto en células humanas (González-García *et al.*, 2009) como de ratón (Mosquera *et al.*, en preparación). De acuerdo con estos datos, se ha demostrado que Notch1 regula la expresión de la cadena IL-7R $\alpha$  durante el desarrollo T de una manera estadio-específica. A nivel proteico, la cadena IL-7R $\alpha$  se expresa por primera vez en progenitores ETPs en tránsito hacia el estadio DN2 (Porritt *et al.*, 2004), disminuyendo de forma gradual hasta desaparecer antes del estadio DP, aunque vuelve a expresarse en timocitos SP que han sufrido la selección positiva (Munitic *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004; 2006).

#### **2.4. Función y regulación de Notch1 en el desarrollo tardío de los linfocitos T**

Las poblaciones intratímicas posteriores a la selección- $\beta$ , como las células DP, poseen niveles muy bajos tanto de Notch1 activo como del receptor en membrana. Varios estudios de ganancia de función han demostrado que la señalización constitutiva de Notch1 puede afectar a la diferenciación, la supervivencia y la proliferación de la población de timocitos DP (Deftos *et al.*, 2000; Fowlkes and Robey, 2002; Izon *et al.*, 2001). Además, también se ha sugerido que esta disminución de Notch1 es necesaria para impedir las propiedades oncogénicas tanto de Notch1 como de sus genes diana (Weng *et al.*, 2006).

Finalmente, el papel de Notch1 en la decisión de linaje CD4 vs. CD8 durante la selección positiva ha sido muy discutido. Experimentos de ganancia de función sugirieron que la activación de Notch1 inducía un aumento en la generación de células CD8SP frente a las células CD4SP (Robey *et al.*, 1996). Sin embargo, estudios posteriores inhibiendo de forma condicional Notch1 en el estadio DN3, no dieron lugar a ninguna diferencia en la generación de las células CD8SP vs. CD4SP (Wolfer *et al.*, 2001). Para resolver esta controversia se realizaron experimentos inhibiendo mediadores de la vía de Notch. Así, la delección condicional de CSL (Tanigaki *et al.*, 2004) o la inducción de dnMAML-1 (Tu *et al.*, 2005), inducía una generación normal de



timocitos SP, descartando de esta manera la hipótesis de que Notch1 pudiera tener un papel en este proceso.

### 3. La vía de señalización de Wnt

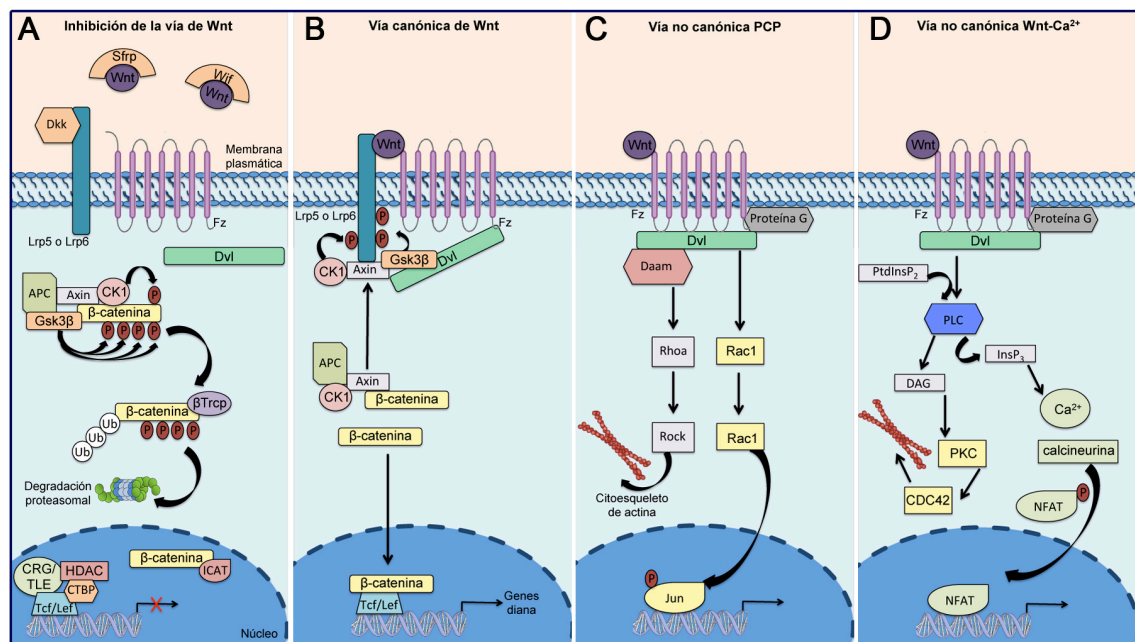
Durante el desarrollo embrionario, la señalización mediante las vías de Notch y Wnt proporcionan señales de proliferación celular y decisiones de linaje en una gran variedad de tejidos. La relación funcional entre ambas vías de señalización es compleja y se han descrito activaciones complementarias o mutuamente excluyentes en procesos como la hematopoyesis o la neurogénesis (revisado en Hayward *et al.*, 2008). Por otro lado, la vía de señalización de Wnt controla la proliferación celular, el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas y las decisiones de destino celular; así como la organización de los movimientos celulares y el establecimiento de la polaridad en los tejidos, siendo frecuente su desregulación en distintos tipos de cánceres.

#### 3.1. Vías de señalización de Wnt

Los factores Wnt son una gran familia de ligandos secretados, ricos en cisteínas, compuestos por 19 miembros en humanos y ratón. Estos factores son una familia de proteínas solubles con gran importancia durante el desarrollo embrionario y en la regulación de la homeostasis tisular (revisado en Logan and Nusse, 2004). Los receptores de Wnt son proteínas trans-membrana de la familia *Frizzled* (Fz), de los que se han descrito diez miembros presentes en humanos y en ratón (revisado en Wang *et al.*, 2006). Además de las proteínas Fz, se han descrito correceptores de Wnt como los receptores de lipoproteínas de baja densidad Lrp5 y Lrp6 (del inglés, *Lipoprotein Receptor-related Protein*). Hay descritas tres vías de señalización por Wnt: la vía canónica de Wnt, en la que está involucrada la  $\beta$ -catenina; la vía PCP (del inglés, *Planar Cell Polarity*) y la vía de Wnt- $\text{Ca}^{2+}$  (**Figura 6**).

La vía canónica de Wnt, también llamada vía de Wnt/ $\beta$ -catenina, se encuentra conservada en una gran variedad de especies (revisado en Logan and Nusse, 2004). En ausencia de unión entre Wnt y su receptor,  $\beta$ -catenina se encuentra marcada para su degradación a través del proteasoma por un complejo de destrucción (Aberle *et al.*, 1997) (**Figura 6A**). De este modo, en el núcleo, Tcf (del inglés, *T-Cell Factor*) y Lef1 (del inglés, *Lymphoid Enhancer Binding Factor 1*) se encuentran unidos a un complejo

represor de la transcripción que silencia los genes diana de Wnt (Roose *et al.*, 1998). La activación de la vía ocurre en la membrana celular, donde las proteínas Wnt se unen al receptor Fz y al correceptor Lrp5/6 para activar la cascada de señalización, que implica el desensamblaje del complejo represor, estabilizando de esta forma la  $\beta$ -catenina. La estabilización de la  $\beta$ -catenina citoplasmática permite su translocación al núcleo, donde se forma el complejo  $\beta$ -catenina-Tcf/Lef1, que activa la transcripción de los genes diana de Wnt (MacDonald *et al.*, 2009) (**Figura 6B**).



**Figura 6. Vías de señalización de Wnt.**

Para la señalización a través de las vías no canónicas de Wnt no es necesaria la expresión ni de Lrp5/6 ni de  $\beta$ -catenina (**Figura 6C**). La vía PCP se inicia normalmente mediante Wnt5a y Wnt11 a través de Fz, Dvl y proteínas G, activando la vía Rhoa (del inglés, *Ras Homologue gene-family member A*) –Rock (del inglés, *Rho associated Coiled-coil-containing protein Kinase*), además de Rac1 y Jnk (del inglés, *Jun N-terminal Kinase*) mediando en la reorganización del citoesqueleto (Endo *et al.*, 2004). Además, la vía PCP puede inhibir la vía canónica de Wnt en linfocitos, disminuyendo los niveles de  $\beta$ -catenina (Liang *et al.*, 2003; 2007). Otra vía no canónica de Wnt es la vía de Wnt-Ca<sup>2+</sup> (**Figura 6D**). Una vez unido el complejo Wnt-Fz, junto a proteínas G, se produce la activación de enzimas sensibles a calcio. A través de la fosfolipasa C (PLC), la PKC (del inglés, *Protein Kinase C*) y la calcineurina, se regula la dinámica del citoesqueleto y la

adhesión celular, mediante la regulación de los niveles de calcio intracelulares (MacDonald *et al.*, 2009).

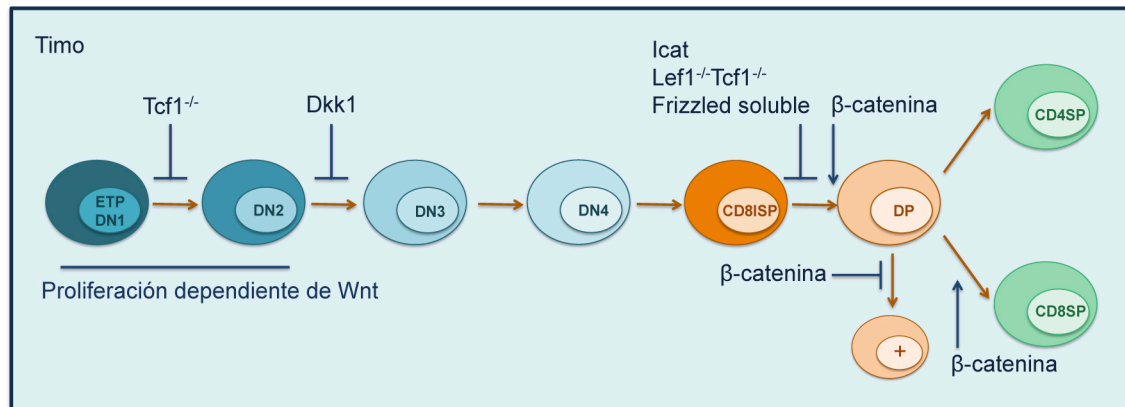
### 3.2. Función de la vía de Wnt en el desarrollo temprano de los linfocitos T

Los primeros estudios que analizaron la señalización mediada por Wnt en el sistema inmunitario fueron aquellos que investigaron la importancia de estos factores en el desarrollo de los linfocitos T en el timo (**Figura 7**). Así, se trató la posibilidad de que la vía de Wnt fuera una vía importante durante este proceso, debido a que ambos tipos de TECs presentes en el timo expresan varios factores Wnt y receptores Fz (Brunk *et al.*, 2015), pudiendo contribuir a la generación del microambiente intratímico necesario para la diferenciación de los linfocitos T.

Inicialmente se creía que el efector de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina, Tcf-1, sólo regulaba la proliferación y supervivencia celular durante el desarrollo de los linfocitos T, sin contribuir al proceso de diferenciación. Sin embargo, dos grupos de manera independiente, evaluaron el desarrollo temprano de los linfocitos T en ausencia de Tcf-1, demostrando que los ratones deficientes para Tcf-1 presentan un bloqueo completo de la diferenciación T a nivel de los progenitores ETP (Germar *et al.*, 2011; Weber *et al.*, 2012). Por tanto, estos resultados demostraron el papel crítico de Tcf-1 durante la especificación de linaje T. Mientras que el grupo de F. Gounari propuso que Tcf-1 podría controlar la supervivencia de los progenitores ETP (Germar *et al.*, 2011), el grupo de A. Bhandoola indicó que Tcf-1 podría regular la expresión de genes esenciales para la determinación de linaje T (Weber *et al.*, 2012). Sin embargo, ambos grupos identificaron el mismo sitio de unión de CSL en el promotor del gen *Tcf1*, indicando que la señalización a través de Notch1 regula la expresión de Tcf-1 y demostrando que la regulación de la determinación de linaje T por Tcf-1 es independiente de la vía de Wnt.

Además, la importancia de la  $\beta$ -catenina durante el desarrollo de los linfocitos T ha generado mucha controversia. El grupo de F. Radke demostró que en ratones trasplantados con HSCs en las que previamente se había producido la delección de manera inducible de  *$\beta$ -catenina*, no presentaban ningún defecto en la generación de células T (Cobas *et al.*, 2004). Sin embargo, este resultado lo atribuyeron al posible efecto redundante entre  $\beta$ -catenina y  $\gamma$ -catenina, capaz de minimizar los efectos generados por esta delección. De hecho, se ha demostrado que la señalización a través

de Wnt es esencial para la proliferación de las poblaciones DN. Estudios realizados en ratones deficientes en Wnt1 y Wnt4 mostraron una reducción del número de timocitos totales (Mulroy *et al.*, 2002), indicando que los factores Wnt son necesarios para su proliferación. Además, el inhibidor soluble de la vía de Wnt, Dkk1, es capaz de inhibir la proliferación de los timocitos de una manera dosis dependiente durante los estadios DN (Weerkamp *et al.*, 2006b).



**Figura 7. Función de la vía de Wnt durante el desarrollo de los linfocitos T.**

### 3.3. Función de la vía de Wnt en el desarrollo tardío de los linfocitos T

Se ha demostrado que la señalización mediada por Wnt también es muy importante durante el proceso de generación de las células DP. En cultivos organotípicos de timo fetal o FTOC (del inglés, *Fetal Thymic Organ Culture*), se demostró que el secuestro de proteínas Wnt por receptores Fz solubles inhibía la activación de la vía de señalización, provocando un bloqueo en la transición de DN a DP a partir de progenitores de hígado fetal de ratón (Staal *et al.*, 2001). Estos datos están en concordancia con otros posteriores en los que la expresión de ICAT, que inhibe la activación de Wnt impidiendo la unión de β-catenina a Tcf1 y Lef1, bloqueaba esta transición sin afectar a los estadios posteriores (Pongracz *et al.*, 2006). De forma análoga, los ratones deficientes para Tcf1 y Lef1 presentan un bloqueo completo de la diferenciación T en el estadio CD8ISP, impidiendo la progresión hacia el estadio DP (Okamura *et al.*, 1998).

Otro aspecto crítico del desarrollo de los timocitos DP dependiente de la señalización a través de Wnt es su supervivencia, debido a que la estabilización de β-

catenina incrementa la supervivencia de los timocitos DP (*Hossain et al.*, 2008; *Xie et al.*, 2005). De hecho, se ha demostrado que la estabilización de la  $\beta$ -catenina induce la acumulación de los timocitos DP susceptibles de sufrir una transformación maligna (*Gou et al.*, 2007).

Además, existen evidencias que indican que la vía de Wnt también regula aspectos de la selección positiva, y por lo tanto, de la transición de DP a SP; aunque la vía canónica de Wnt está menos activa durante estos estadios del desarrollo (*Weerkamp et al.*, 2006a). La sobre-expresión de la forma estable de  $\beta$ -catenina afecta a la selección positiva, acelerando la generación de los timocitos CD8SP a través de un aumento en la señalización del IL-7R (*Yu et al.*, 2007). De esta forma, la generación de células CD4SP y CD8SP ocurre de forma simultánea en estas condiciones, al contrario que en una situación normal en la que la generación de CD8SP ocurre después de la generación de los timocitos CD4SP (*Yu and Sen*, 2007).

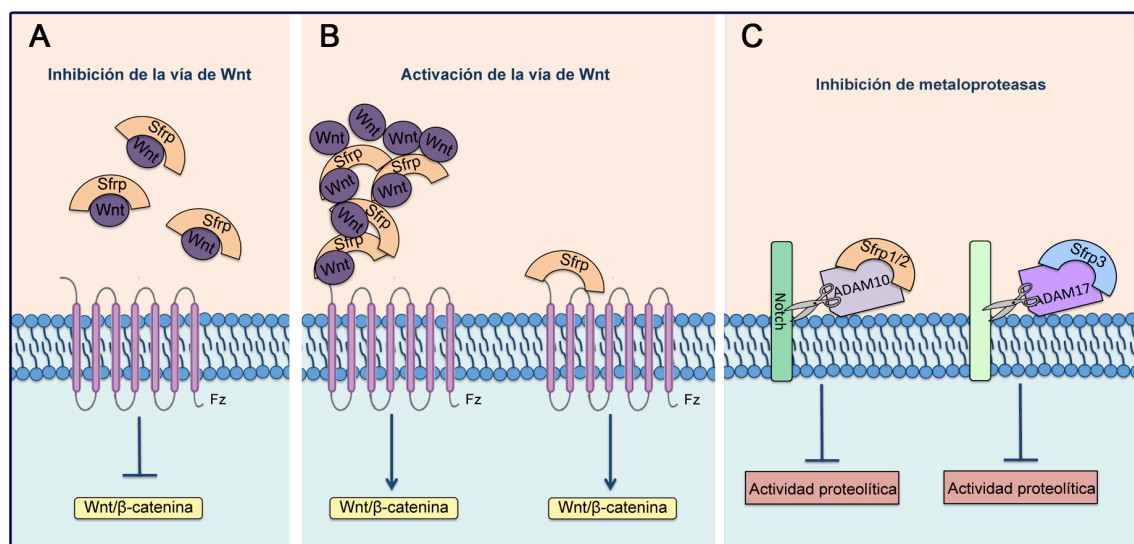
Finalmente, la activación constitutiva de la vía de Wnt mediante la sobre-expresión de la forma activa de  $\beta$ -catenina provocaba la generación de una mayor cantidad de timocitos maduros (*Mulroy et al.*, 2003), pudiendo evadir los requerimientos de señalización del pre-TCR debido a que carecen de este (*Gounari et al.*, 2001; *Goux et al.*, 2005). Además, el estudio de pérdida de función mostró que la ausencia de  $\beta$ -catenina en células T impide su diferenciación durante el proceso de selección- $\beta$ , provocando un marcado descenso en el número de células T en periferia (*Xu et al.*, 2003).

## 4. Los factores Sfrps

### 4.1. Estructura y función de las proteínas Sfrps

La vía de Wnt está regulada por una variedad de proteínas secretadas como Wifs (del inglés, *Wnt Inhibitory Factors*), *Cerberus*, *Sclerostin*, miembros de la familia *Dickkopf* (Dkk) y Sfrps (del inglés, *Secreted Frizzled-Related Proteins*) (**Figura 8**) que compiten por la unión de Wnt a sus receptores. Los factores Sfrp (1-5 en mamíferos), son una familia de proteínas solubles formadas por dos dominios de auto-plegamiento independientes con funciones redundantes en algunos sistemas (*Bovolenta et al.*, 2008; *Kawano and Kypta*, 2003). En el extremo N-terminal se encuentra el péptido señal

seguido del dominio CRD (del inglés, *Cystein Rich Domain*). El dominio CRD está formado por diez residuos de cisteína en posiciones conservadas, generando un patrón de puentes disulfuro (Chong *et al.*, 2002); además, este dominio comparte una alta homología con el dominio extracelular de los receptores Fz de Wnt (Hoang *et al.*, 1996; Leyns *et al.*, 1997). El extremo C-terminal de los factores Sfrp está formado por segmentos con residuos cargados positivamente que le confieren propiedades de unión a heparina (Üren *et al.*, 2000), y seis cisteínas que forman tres puentes disulfuro, formando el dominio NTR (del inglés, *Netrin-Related Motifs*). Inicialmente, los factores Sfrp fueron descritos como antagonistas de la vía de Wnt, debido a su capacidad de unirse a ellos y secuestrarlos a través del dominio CRD, bloqueando de esta manera su señalización (Leyns *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997) (**Figura 8A**).



**Figura 8. Función de los factores Sfrp.**

Además, también se ha demostrado que el dominio CRD de los factores Sfrp es capaz de modular la vía de Wnt de forma independiente (Bhat *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 1997). Sin embargo, la función de los factores Sfrp en la vía de Wnt es más compleja, debido a que algunos estudios han demostrado que también pueden activarla (Esteve *et al.*, 2011b; Mii and Taira, 2011) (**Figura 8B**) o funcionar de manera independiente de la vía de Wnt, lo que ha dificultado la capacidad de definir el papel fisiológico de estas proteínas. Estudios del grupo de la Dr. Paola Bovolenta (CBMSO) utilizando ratones deficientes para Sfrp1 y Sfrp2, muestran que los factores Sfrp tienen una función independiente de Wnt en la regulación de Notch (**Figura 8C**). El estudio demostró que Sfrp1 y Sfrp2 eran capaces de modular negativamente la vía de señalización de Notch1

mediante el bloqueo de la metaloproteasa Adam10 durante el proceso de neurogénesis de la retina de ratón (Esteve *et al.*, 2011a). Además, se ha descrito recientemente que el factor Sfrp3 es capaz de inhibir la metaloproteasa Adam17 en células humanas (Oldefest *et al.*, 2015) (**Figura 8C**), por lo que estos datos relacionan los factores Sfrp con la vía de Notch de una manera directa.

Finalmente, aunque los factores Sfrp pueden regular la función de Notch, se desconoce su papel durante la diferenciación de los linfocitos T. La única evidencia al respecto es un estudio realizado en 2009, en el que se analizaron los linfocitos T presentes en la sangre periférica de ratones deficientes para Sfrp1, sin encontrar diferencias significativas en estas poblaciones (Renström *et al.*, 2009). Por tanto, son necesarios estudios adicionales para definir el papel de los factores Sfrp durante el proceso de diferenciación de los linfocitos T, constituyendo el objetivo central de nuestro estudio.

### 4.2. Implicación de Sfrp1 en cáncer

Se han relacionado diversas mutaciones activadoras en genes implicados en la vía de Wnt con distintos tipos de cáncer como melanoma, cáncer gastrointestinal y distintos tipos de leucemia (Revisado por Zhan *et al.*, 2016). Estas mutaciones provocan una sobre-expresión de  $\beta$ -catenina, asociada con el crecimiento incontrolado de las células y su incapacidad para diferenciarse. En este contexto, parece lógico pensar en la capacidad anti-oncogénica de los factores Sfrp, debido a su capacidad de modular negativamente la vía de Wnt. En algunos modelos de cáncer, el incremento en los niveles de Sfrp1 reduce el crecimiento tumoral, como por ejemplo en algunos tipos celulares de cáncer de mama (Matsuda *et al.*, 2009). Además, la sobre-expresión de Sfrp1 en células de cáncer cervical induce apoptosis e inhibe la proliferación celular y la invasión *in vitro* e *in vivo* (Chung *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de estos resultados no se observa la aparición de tumores espontáneos en los ratones deficientes para Sfrp1 (Trevant *et al.*, 2008), sugiriendo la necesidad de alteraciones genéticas adicionales para la generación tumoral. Además, de acuerdo con la función anti-oncogénica de los factores Sfrp, se ha podido observar la pérdida de expresión de estos factores en una gran cantidad de cánceres como en tumores de mama (Turashvili *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 1998), gástricos (To *et al.*, 2001) y cervicales (Ko *et al.*, 2002). Otro tipo de tumores en los que se ha descrito la pérdida de los factores Sfrp es en los



tumores hematológicos como el mieloma múltiple (Jost *et al.*, 2009), la leucemia linfocítica crónica (Liu, 2006) y la leucemia mieloide aguda (Hou *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2011). Esta pérdida de Sfrp suele suceder mediante dos mecanismos distintos: la pérdida alélica o el silenciamiento epigenético, siendo este último el más común en los cánceres hematológicos.

## 5. La leucemia T linfoblástica aguda

La leucemia linfoblástica aguda T o T-ALL (del inglés, *T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia*) es un proceso linfoproliferativo resultado de la transformación maligna en el timo de los progenitores de las células T. La T-ALL afecta a un 10%-15% de los casos pediátricos y un 20-25% de los casos adultos de leucemias linfoblásticas agudas (Pui *et al.*, 2008). Los pacientes de T-ALL muestran infiltración de linfoblastos maduros en la MO y la sangre, adenopatías y un alto riesgo de afectación del sistema nervioso central debido a la infiltración de las células leucémicas (Uckun *et al.*, 1997). El pronóstico de la T-ALL ha mejorado gradualmente con la introducción de quimioterapia intensiva en los tratamientos, generando tasas de supervivencia de más del 75% en niños y de un 50% en adultos (Pui *et al.*, 2008). Sin embargo, esta enfermedad se asocia con altas tasas de recaída que tienen un pronóstico grave, por lo que es importante desarrollar nuevas terapias para su tratamiento.

La T-ALL es el resultado de la acumulación de alteraciones genéticas en diferentes oncogenes, supresores tumorales y genes implicados en vías de desarrollo responsables del crecimiento, proliferación, supervivencia y diferenciación de los linfocitos T. Aproximadamente el 50% de las T-ALL muestran un cariotipo anormal, probablemente debido a recombinaciones ilegítimas del TCR, esto induce translocaciones cromosómicas que implican la yuxtaposición de promotores o *enhancers* de los genes del TCR con determinados factores de transcripción como TAL1, LYL1, LMO1 y LMO2, HOX11 y HOX11L2, MYC y MYB. La gran diversidad de alteraciones genéticas involucradas en la patogénesis de la T-ALL hacen que la oncogénesis de esta enfermedad sea muy compleja, pudiendo verse afectadas un gran número de moléculas y procesos celulares que resultan desregulados como el ciclo celular, el crecimiento y proliferación, remodelación de la cromatina, auto-renovación y diferenciación T (revisado en Belver and Ferrando, 2016). Una de las relaciones más claras entre el proceso normal de diferenciación de las células T y su desregulación



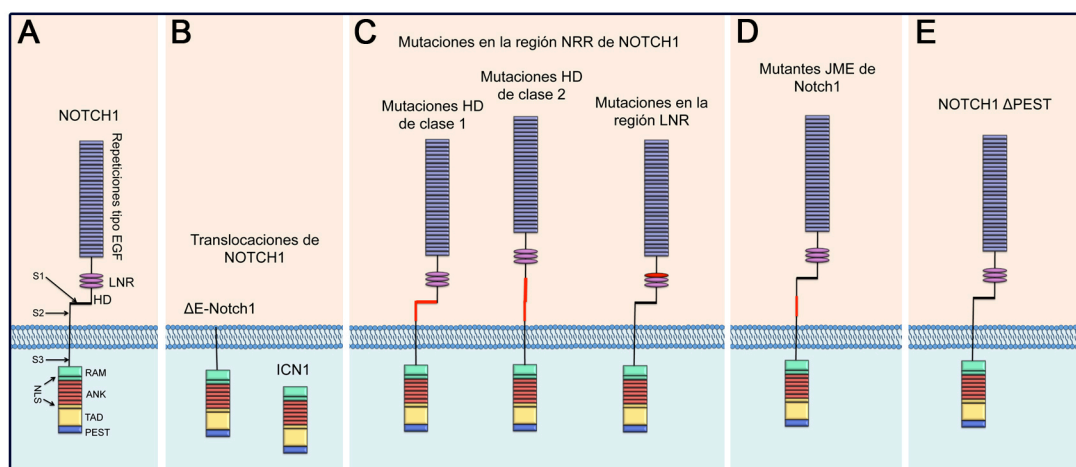
durante la oncogénesis de la T-ALL es la activación de Notch1. Notch1, factor esencial para el desarrollo T, se encuentra activado constitutivamente en más del 60% de las leucemias T-ALL, debido a la presencia de mutaciones de ganancia de función (Weng *et al.*, 2004).

### 5.1. Función oncogénica de Notch1 en T-ALL

La activación aberrante de Notch1 en T-ALL fue descrita por primera vez en un tipo raro de T-ALL caracterizada por la translocación cromosómica t(7;9)(q34;q34.3), presente en menos del 1% de las T-ALLs (**Figura 9B**). Este reordenamiento provoca la yuxtaposición de la porción N-terminal de Notch1 bajo el control transcripcional del *enhancer* del TCR $\beta$ , generando una forma truncada de Notch1 parecida al dominio intracelular activo, que inicialmente se denominó TAN-1 (Ellisen *et al.*, 1991). El potencial oncogénico de esta forma activa de Notch1 fue demostrado en ratones trasplantados con progenitores de MO infectados con retrovirus que sobre-expresaban de manera constitutiva la molécula TAN-1 (Pear *et al.*, 1996). Debido a que este tipo de mutaciones se encontraba con muy baja frecuencia en las T-ALL, estos descubrimientos fueron infravalorados durante años. Sin embargo, esta visión cambió radicalmente cuando el grupo de J. Aster demostró que más del 60% de los pacientes con T-ALL presentan mutaciones activadoras en *NOTCH1* (Weng *et al.*, 2004). Este descubrimiento posicionó a Notch1 en el punto de mira para el estudio de esta enfermedad.

Las mutaciones más frecuentes en *NOTCH1*, encontradas en aproximadamente el 40% de las T-ALLs humanas, se encuentran en los exones 26 y 27, que codifican para las regiones N-terminal y C-terminal del dominio HD (Weng *et al.*, 2004) (**Figura 9C**). La base estructural para entender el mecanismo de acción de estas mutaciones quedó resuelta con la obtención de la cristalografía del complejo LNR-HD de Notch1, donde se observa que el dominio LNR actúa como escudo protegiendo el sitio de corte S2 (**Figura 4**) de las metaloproteasas extracelulares (Gordon *et al.*, 2009). La mayoría de las mutaciones en el dominio HD de *NOTCH1* (clase 1, HD1), son típicamente sustituciones de un solo aminoácido y pequeñas deleciones e inserciones, que comprometen la estabilidad del complejo LNR-HD, provocando una hipersensibilidad al ligando o una activación de la vía independiente de ligando (Malecki *et al.*, 2006). Las mutaciones HD de clase 2 (HD2) son inserciones más largas localizadas en la parte

distal del dominio HD, alejando el sitio de corte S2 de la protección del complejo LNR-HD, exponiéndolo a las metaloproteasas extracelulares (Malecki *et al.*, 2006); ocurriendo algo similar con la mutación H1545P localizada en el dominio LNR (Gordon *et al.*, 2009). Por otro lado, los mutantes JME (del inglés, *Juxtamembrane Expansion Mutants*), poseen un receptor más largo que induce una mayor activación de la vía dependiente de ligando (**Figura 9D**). Finalmente, las mutaciones en el dominio PEST ( $\Delta$ PEST), presentes en el 20-25% de los casos de T-ALL, provocan la pérdida de este dominio mediante codones de parada prematuros, evitando de esta manera la degradación de ICN1 (Weng *et al.*, 2004) (**Figura 9E**).



**Figura 9. Formas oncogénicas de Notch1 en T-ALL.** (A) Forma inactiva de Notch1 unido a la membrana, se muestra con sus dominios funcionales. (B) Translocaciones cromosómicas entre Notch1 y el loci del TCR, las cuales inducen formas truncadas de Notch1. (C) Mutaciones en la región NRR de Notch1, abarcando los dominios HD y LNR, responsables de mantener el receptor en forma inactiva. (D) Expansiones yuxtamembrana en Notch1, son inserciones que generan un receptor más largo, provocando una mayor activación de la vía. (E) Mutantes Notch1 con el dominio PEST truncado, impidiendo la degradación proteasomal de la forma activa de Notch1 (ICN1).

Estudios realizados en ratones demuestran que las diferentes mutaciones de ganancia de función de *NOTCH1* poseen distintos potenciales para la generación de T-ALLs (Chiang *et al.*, 2008). La expresión en precursores hematopoyéticos de las formas menos comunes de *NOTCH1* mutado, como las translocaciones, son suficientes para generar una T-ALL *in vivo* tanto en modelos de ratón (Pear *et al.*, 1996) como humanos (García-Peydró *et al.*, en revisión). Sin embargo, las variantes más comunes en los pacientes, como las mutaciones HD o  $\Delta$ PEST, aunque inducen la generación ectópica de linfocitos T por sí mismas, necesitan la cooperación de factores oncogénicos adicionales para provocar el desarrollo tumoral (Chiang *et al.*, 2008; Eguchi-Ishimae *et al.*, 2007). Estos descubrimientos, sugieren que las mutaciones activadoras de *NOTCH1*

podrían actuar como un evento inicial en la patogénesis de la T-ALL, sin ser la mutación oncogénica principal, incrementando la población de progenitores T en riesgo de sufrir mutaciones cooperadoras adicionales (Eguchi-Ishimae *et al.*, 2007).

### 5.2. Vías oncogénicas activadas por Notch1 en T-ALL

En los últimos años se ha empleado mucho esfuerzo en dilucidar cuáles son las vías oncogénicas controladas por la activación aberrante de Notch1 en T-ALLs. El análisis de los genes diana y de perfiles genéticos de expresión regulados por Notch1 han mostrado que Notch1 promueve el crecimiento de la leucemia mediante la activación transcripcional de rutas anabólicas, incluidas la biosíntesis de ribosomas, la traducción proteica y el metabolismo de los nucleótidos y aminoácidos (Palomero *et al.*, 2006b; Weng *et al.*, 2006). Además, el mapeo de los sitios de unión de Notch1 en el ADN ha resaltado el papel fundamental de los *super-enhancers* en la regulación de los genes diana de Notch1 (Wang *et al.*, 2014). Los efectos sobre el crecimiento celular que ejerce el programa transcripcional de Notch1 se potencian mediante la regulación del oncogén *Myc*, una diana directa de Notch1 (Herranz *et al.*, 2014; Palomero *et al.*, 2006b; Yashiro-Ohtani *et al.*, 2014). De hecho, la inhibición condicional de c-myc en células DP que expresan ICN1 impide la formación de tumores, lo que indica que ambos son necesarios para el mantenimiento tumoral (Li *et al.*, 2008). Además, c-myc también induce la activación de rutas anabólicas, y Notch1 y c-myc comparten distintos genes diana (Palomero *et al.*, 2006b; Sánchez-Martín *et al.*, 2017). También se ha demostrado que la señalización de Notch1 en T-ALL promueve el crecimiento y la proliferación celular incrementando la fase G1/S del ciclo celular (Joshi *et al.*, 2009). La expresión de los genes del ciclo celular CDK4, CDK6 y la ciclina D3 aumentan con la activación de Notch1 en T-ALL. Además, la ciclina D3 es una diana directa de Notch1 necesaria para la generación de leucemias inducidas por ICN1 (Joshi *et al.*, 2009). Otra diana directa de Notch1 es el factor de transcripción Hes1 (Jarriault *et al.*, 1995), que juega un papel crucial durante el desarrollo de los linfocitos T y en la generación de leucemias inducidas por Notch1 (Wendorff *et al.*, 2010). Por otro lado, Hes1 ha sido implicado en la activación de las vías de PI3K y NF- $\kappa$ B a través de la activación de Notch1 (Espinosa *et al.*, 2010; Palomero and Ferrando, 2008). Finalmente, estudios de nuestro grupo han demostrado que Notch1 regula directamente la expresión del IL-7R en progenitores T y en T-ALL (González-García *et al.*, 2009). Además, la expresión del IL-7R así como del

pre-TCR, también regulada por Notch1, son necesarias para la generación de leucemias inducidas por ICN1 (Mosquera *et al.*, en preparación).

### 5.3. Notch1 como diana terapéutica en el tratamiento de la T-ALL

La gran proporción de leucemias T-ALL que portan mutaciones en el gen *NOTCH1* ha generado un gran interés en el desarrollo de terapias anti-Notch1 para el tratamiento de esta enfermedad. Hasta la fecha, la mayor parte de este esfuerzo se ha centrado en inhibir el complejo  $\gamma$ -secretasa, mediante la utilización de GSI (del inglés, *Gamma-Secretase Inhibitor*). El tratamiento con GSI de líneas celulares T-ALL que poseen mutaciones activadoras de *NOTCH1* induce una rápida disminución de ICN1 en el interior celular y una inhibición transcripcional de los genes diana de Notch1. Además, este efecto va acompañado de una parada en el ciclo celular en G1 y una disminución en el tamaño celular (Palomero *et al.*, 2006a; Weng *et al.*, 2004). Por otro lado, el tratamiento con GSI de células primarias de T-ALL previene la progresión de la leucemia en ratones inmunodeficientes, sugiriendo que la inhibición de Notch1 puede afectar a la capacidad de auto-renovación de la T-ALL (Armstrong *et al.*, 2009; Tatarek *et al.*, 2011). Gracias a estos prometedores resultados, se lanzó un ensayo clínico (Dana-Farber Cancer Institute 04-390) con el objetivo de testar el efecto de un GSI administrado oralmente en pacientes de T-ALL con recidiva. En este ensayo, el tratamiento con GSI inhibía los genes diana de Notch1 en las células de la leucemia, pero un gran número de pacientes desarrollaron problemas gastrointestinales dosis-dependientes (DeAngelo *et al.*, 2006). Estos problemas derivados del uso de GSI han animado a otros investigadores a desarrollar terapias anti-Notch1 alternativas. El uso de péptidos MAML1 dominantes negativos puede interferir con la formación del complejo de transcripción ICN1-RBPJk-MAML1 en el núcleo celular e inhibir la señalización de Notch1 (Weng *et al.*, 2003), pero esto podría inhibir los cuatro receptores Notch provocando mayores efectos secundarios. Por otra parte, el desarrollo de anticuerpos específicos para inhibir la señalización a través de Notch1, podría proporcionar un tratamiento más específico estabilizando el complejo HD-LNR y manteniendo de esta manera el receptor en estado inactivo (Weng *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2010). Finalmente, también se ha planteado la inhibición del procesamiento de Notch1 mediante el uso de inhibidores de la metaloproteasa Adam10 (Bozkulak and Weinmaster, 2009; Sulis *et al.*, 2011), lo que abre perspectivas adicionales para encontrar nuevas terapias anti-Notch1 necesarias para el tratamiento de la T-ALL. Dado el papel descrito para los factores Sfrp

en la modulación de la activación de Notch1 en otros sistemas, en este trabajo de tesis doctoral , hemos analizado la posible función de Sfrp en la regulación de la señalización por Notch1 en T-ALL, con el fin de identificar nuevas estrategias de posible aplicación terapéutica para el tratamiento de esta enfermedad.

# OBJETIVOS

El objetivo global de esta tesis doctoral ha sido determinar la posible función reguladora de *Sfrp1* sobre la activación de *Notch1*, y analizar su relevancia fisiológica durante el desarrollo intratímico de los linfocitos T de ratón. Asimismo, el estudio pretende establecer la posible contribución de *SFRP1* a la patogenia de la leucemia linfoblástica aguda de tipo T (T-ALL) portadora de mutaciones activadoras de *NOTCH1*.

Para ello, hemos planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Estudio de la relevancia funcional de *Sfrp1* durante el desarrollo fisiológico de los linfocitos T de ratón.
2. Análisis de la función de *SFRP1* en la patogenia de la leucemia T-ALL humana dependiente de la activación de *NOTCH1*.
3. Estudio de la regulación epigenética y de las mutaciones de *SFRP1* en la leucemia T-ALL humana.

# MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. Líneas celulares.

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo, su fenotipo y su origen se describen en la **Tabla 1**. Los fibroblastos de riñón humano 293T se cultivaron en medio DMEM, y las líneas celulares T en medio RPMI 1640 (Lonza), ambos suplementados con antibióticos (penicilina y estreptomicina), 10 mM Hepes (Invitrogen) y 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Invitrogen). La línea estromal OP9-GFP se cultivó en medio  $\alpha$ -MEM (Gibco, Invitrogen) suplementado con antibióticos y 20% de FBS.

Nombre	Fenotipo	Referencia
293T	Fibroblastos de riñón humano	DuBidge <i>et al.</i> , 1987
CUTLL1	T-ALL DP TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>	Palomero <i>et al.</i> , 2006a
DND41	T-ALL TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>	Drexler <i>et al.</i> , 1985
HPB-ALL	T-ALL DP TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>	Morikawa <i>et al.</i> , 1978
JURKAT	T-ALL CD4SP	Schneider <i>et al.</i> , 1977
OP9-GFP	Estroma médula ósea ratón	Schmitt y Zúñiga-Pflücker, 2002
SUPT1	T-LL DP TCR $\alpha\beta$ CD3 <sup>+</sup>	Smith <i>et al.</i> , 1986

**Tabla 1. Líneas celulares utilizadas en este estudio.** ALL: leucemia linfoblástica aguda, LL: linfoma linfoblástico.

## 2. Muestras de leucemias primarias.

Las muestras de leucemias primarias T-ALL fueron cedidas por el Dr. Stefano Indraccolo (Istituto Oncologico Veneto-IRCSS, Padova) y el Dr. Adolfo Ferrando (Columbia University, NY). Tanto la obtención de las muestras humanas como el diseño de los experimentos se realizaron con el consentimiento del Comité de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. El consentimiento informado de los pacientes fue obtenido de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

### 3. Procesamiento de tejidos, hibridación *in situ* e inmunohistoquímica.

#### 3.1. Procesamiento de tejidos.

Los embriones de E15,5 y los timos de ratones neonatos fueron fijados por inmersión en 4% de paraformaldehído (PFA) en tampón fosfato 0,1M (peso/volumen) durante dos horas a temperatura ambiente. El tejido se lavó con tampón fosfato-salino (PBS) durante 24 horas, tras lo cual se introdujo en una solución de sacarosa al 30% en PBS (peso/volumen). Finalmente, los embriones y los timos fueron embebidos y congelados en una solución de 7,5% gelatina en 15% de sacarosa (peso/volumen) y posteriormente cortados con el criostato.

#### 3.1. Hibridación *in situ*.

Para los ensayos de hibridación *in situ* las secciones de criostato de 20-25  $\mu\text{m}$  se lavaron una vez con PBS (10 minutos) y se fijaron posteriormente en PFA al 4% durante 10 minutos, tras lo cual se hicieron tres lavados de PBS durante 5 minutos cada uno. Las muestras se acetilaron durante 10 minutos con buffer de acetilación (Trietanolamina 1x, 0,25% ácido anhídrico y 0,2% HCL al 37%, en  $\text{H}_2\text{O}$ ) y se lavaron dos veces en PBS durante 5 minutos y otros 5 minutos con 0,1% TX-100 en PBS. Posteriormente, las secciones fueron pre-hibridadas con tampón de hibridación (SSC 1x, 50% formamida desionizada, 10% dextran sulfato, tRNA a 1mg/mL, Denhart's 1x, diluido en  $\text{H}_2\text{O}$ ) una hora a temperatura ambiente. Una vez finalizado este tiempo, se pasó a la fase de hibridación, para la cual se usaron las siguientes sondas marcadas con digoxigenina (Roche): Sfrp1, Sfrp2, Adam10 (cedidas por la Dra. Paola Bovolenta), Lef1 (cedida por el Dr. J. Galcerán), Notch1 y Hes1 (cedidas por el Dr. Ish-Horowicz). Las sondas fueron desnaturalizadas a 82°C durante 3 minutos y posteriormente añadidas al tampón de hibridación. Las secciones se hibridaron durante una noche a 72°C. Durante la fase de post-hibridación las secciones fueron lavadas con SSC 5x pH 4,5 a 72°C y posteriormente lavadas con SSC 0,2x a 72°C durante una hora y media, tras lo cual se incubaron con SSC 0,2x a temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente, se realizaron dos lavados con tampón MABT (Ácido Maleico 0,1M, NaCl 0,15M y 0,1% Tween 20, ajustado con NaOH a pH7,5 en  $\text{H}_2\text{O}$ ) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, se usó una solución de bloqueo (2% Blocking Reagent, Roche) en tampón MABT y se incubaron las secciones durante una hora a temperatura ambiente. Después se añadió el anticuerpo anti-dig-AP (1:5000, Roche) en la solución

de bloqueo y se dejó a temperatura ambiente durante una noche. Finalmente, las secciones se lavaron seis veces con tampón TBS-T a pH7,5 (0,1M Tris pH7,5, 0,15M NaCl, 0,1% Tween) a temperatura ambiente y cuatro veces con tampón TBST a pH9,5 (0,1M Tris pH9,5, 0,15M NaCl, 0,1% Tween) a temperatura ambiente. Las secciones se equilibraron a través de 2 lavados con tampón NTMT (TrisHCl 0,1 M pH9.5, NaCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 50mM y 0,1% Tween20 en H<sub>2</sub>O) durante 10 minutos, para ser finalmente reveladas con tampón NBT/BCIP (3,5 ul/ml NBT y 3,5ul/ml BCIP en NTMT) tras lo que se detuvo la reacción con 0,25% Triton X-100 en PBS. Las preparaciones fueron analizadas con un microscopio Leica DM500.

### **3.2. Inmunohistoquímica.**

Para los ensayos de inmunohistoquímica, las secciones de criostato de 15 µm fueron lavadas 3 veces con PBS durante 10 minutos. Después se bloqueó la peroxidasa endógena en una solución de 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol durante 10 minutos, tras los cuales el tejido fue lavado 3 veces con 0,1% TX-100 en PBS (peso/volumen) durante 10 minutos cada vez. Las secciones fueron bloqueadas con tampón de bloqueo (PBS 0,1% TX-100, 5% FBS y de 0,1% BSA) al menos durante una hora a temperatura ambiente, e incubadas posteriormente con el anticuerpo primario en tampón de bloqueo durante una noche a 4°C. Los anticuerpos primarios usados fueron anti-Sfrp1 (1:1000, cedido por la Dra. Paola Bovolenta) y anti-Hes1 (1:200, Cell Signalling). Tras la incubación con el anticuerpo primario, las secciones fueron lavadas con PBS 0.1% TX-100 tres veces durante 10 minutos cada vez. Para la detección de Sfrp1, las secciones se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Alexa 594 (1:1000, Molecular Probes) en tampón de bloqueo. Tras el revelado de Sfrp1 las secciones se incubaron con el anticuerpo primario anti-CD45 biotina (BD Pharmingen) en tampón de bloqueo durante una noche a 4°C, y posteriormente, lavadas con PBS 0.1% TX-100 tres veces durante 5 minutos cada vez. Para la detección de CD45, las secciones se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con estreptavidina marcada con Alexa 488 (1:500, Jackson- InmunoResearch) en tampón de bloqueo. Las secciones con Hes1 fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario acoplado a biotina (1:500, Jackson-InmunoResearch) en tampón de bloqueo, amplificándose con estreptavidina conjugada con peroxidasa (1:500, Jackson- InmunoResearch). El revelado se hizo con el reactivo tiramida cianina 5 (1:100, Perkin Elmer) para amplificar la señal de dicho anticuerpo. Finalmente, los

núcleos fueron teñidos con DAPI y montadas con Mowiol (Calbiochem). Todas las preparaciones fueron analizadas con un microscopio confocal LSM510 (Zeiss).

### 4. Análisis por citometría de flujo.

Los anticuerpos primarios utilizados para la detección de marcadores celulares, tanto de humano como de ratón, por citometría de flujo se detallan en la **Tabla 2**.

Especificidad	Conjugado	Clon	Reactividad	Fuente
Anexina-V	PE	-	-	BD Bioscience
CD3	PE	UCTH1	Humano	BD Bioscience
CD3	APC	UCTH1	Humano	BD Bioscience
CD3ε	Biotina	145-2C11	Ratón	BD Bioscience
CD4	PE-Cy5	13B8.2	Humano	Beckman Coulter
CD4	PerCP	RM4-5	Ratón	BD Bioscience
CD5	FITC	L17F12	Humano	BD Bioscience
CD8	FITC	5H10	Ratón	Invitrogen
CD8	PE	5H10	Ratón	Invitrogen
CD8	PE-Cy7	Rpa-T8	Humano	BD Bioscience
CD8	BV421	53-6.7	Ratón	Biolegend
CD16/32	Sin marcar	2.4G2	Ratón	BD Bioscience
CD25	PerCP	PC61	Ratón	BD Bioscience
CD25	APC	PC61	Ratón	eBioscience
CD27	PE	LG.7F9	Ratón	eBioscience
CD44	PE	IM7	Ratón	BD Bioscience
CD44	BV421	IM7	Humano/Ratón	Biolegend
CD45	V450	2D1	Humano	BD Bioscience
CD117 (c-kit)	FITC	2B8	Ratón	BD Bioscience
CD127 (IL-7Rα)	Biotina	hIL7R-M21	Humano	BD Bioscience
CD127 (IL-7Rα)	Biotina	A7R34	Ratón	eBioscience
TCRαβ	FITC	2D1	Humano	T cell Diagnostics
TCRβ	PE-Cy5	H57-597	Ratón	BD Bioscience

**Tabla 2.** Anticuerpos utilizados para la detección de antígenos mediante citometría de flujo.

Para las tinciones de marcadores de superficie, se tiñeron  $1-2 \times 10^5$  células con cantidades saturantes de anticuerpos durante 20 minutos a 4°C y en oscuridad, en 50  $\mu$ l de solución de tinción (PBS, 1% FBS, 1% BSA y 0,01% azida sódica). Para bloquear posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos a los receptores Fc expresados por distintos tipos celulares, las células procedentes de los bazo, MO e hígados de ratones fueron previamente incubadas con anticuerpos anti-CD16 y anti-CD32 en solución de tinción durante 20 minutos a 4°C. En el caso de anticuerpos acoplados a biotina, se lavaron los anticuerpos primarios con la solución de tinción y se incubaron posteriormente con estreptavidina acoplada al fluorocromo APC (Biolegend), de la misma manera. Para las tinciones intracelulares, las células se fijaron y permeabilizaron previamente utilizando el tampón CytoFix/CytoPerm (BD Biosciences) durante 20 minutos en oscuridad. Para las tinciones de Anexina-V, las incubaciones se realizaron con el tampón de tinción de Anexina (BD Biosciences), según las instrucciones del proveedor. Para el análisis de proliferación mediante el marcaje con bromodesoxiuridina (BrdU), se utilizó BrdU Flow Kits (BD Bioscience), según las instrucciones del proveedor. Como control negativo de tinción se utilizaron anticuerpos irrelevantes del mismo isotipo. Tras las incubaciones, se lavó el exceso de anticuerpo y se analizaron las muestras en un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) o FACSCantoII (BD Biosciences). Los datos fueron analizados posteriormente usando el software FlowJo7.6.5.

## **5. Cultivos organotípicos fetales de ratón (FTOC).**

El seguimiento del proceso de diferenciación T *in vitro* se realizó mediante cultivos organotípicos de ratón. Este sistema de diferenciación consiste en la extracción de los dos lóbulos tímicos de embriones de 15,5 días de gestación. Ambos lóbulos se separaron para analizar mediante citometría de flujo las poblaciones presentes en el timo a día 0 en uno de ellos. El lóbulo restante se transfirió a filtros de nitrocelulosa colocados sobre esponjitas empapadas en medio de cultivo IMDM (Lonza) suplementado con 5% FBS, y se analizó a los días indicados.

## 6. Transducciones lentivirales.

Las transducciones lentivirales se realizaron en líneas celulares y en leucemias primarias T-ALL con el fin de sobre-expresar la proteína SFRP1 humana. La producción de los sobrenadantes se realizó mediante transfección transitoria por lipofección (jetPEI, Polyplus) de la línea empaquetadora 293T con los siguientes vectores: psPAX2 (gag/pol), pMD2G (envuelta VSV.G) y el vector lentiviral pHRSIN. El cDNA de SFRP1 aislado a partir de un vector comercial pUC19-sFRP1 (#HG10680-U, Sino Biological Inc.) mediante PCR (**Tabla 5**) fue clonado en las dianas BamHI y NotI del vector pHRSIN, de forma que la expresión de SFRP1 y GFP estuviera controlada por un único promotor, SFFV. Se recogieron sobrenadantes 48 y 72 horas después de la transfección y se determinó la eficiencia de transfección (porcentaje de células GFP<sup>+</sup>). Para ello, las células se fijaron con el tampón CytoFix/CytoPerm (BD Biosciences) durante 20 minutos en oscuridad, se realizó un lavado con solución de tinción y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo. A continuación, se calculó el título viral de los sobrenadantes obtenidos mediante infección de células 293T con cantidades decrecientes de sobrenadante. Tras 72 horas se determinó por citometría de flujo la proporción de células transducidas (porcentaje de células GFP<sup>+</sup>). Se eligió la cantidad de sobrenadante que infectaba entre el 1 y el 20% de las células y se calculó el título viral como:

### Título viral (Unidades infectivas/ml)

$$= \frac{\text{Nº de células infectadas} \times \text{Frecuencia de células GFP}^+ \times \text{Dilución del sobrenadante}}{\text{Volumen del inóculo (mL)}}$$

Una vez conocido el título viral del sobrenadante, se infectaron las líneas celulares con ratios entre número de unidades infectivas y número de células (MOI) que variaron entre 10-20, en una sola ronda de 24 horas en presencia de polibreno (8µg/ml) y tras centrifugación de 30 min a 1.800 rpm a 25°C. Para la generación de sobrenadantes condicionados las líneas celulares transducidas se cultivaron a una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml en medio RPMI y 0,2% de FBS durante distintos días (1 – 4), tras los cuales las células se centrifugaron 10 minutos a 1.800 rpm y se recogió el sobrenadante del cultivo.

Las leucemias primarias T-ALL se infectaron con MOIs que variaron entre 10 y 30, en una sola ronda de 24 horas en presencia de 50  $\mu\text{g/ml}$  de fibronectina recombinante humana (Retronectin, Takara) y tras centrifugación durante 90 minutos a 1.800 rpm a 25°C. Tras la infección, las células leucémicas se co-cultivaron con una línea celular de estroma de médula ósea de ratón, OP9-GFP, en presencia de IL-7 recombinante humana (200IU/ml). Tras 72 horas, se determinó por citometría de flujo la proporción de células transducidas (porcentaje de células CD45<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>) y se realizó una separación celular mediante citometría de flujo en base a la expresión de los marcadores CD45 y GFP.

## 7. Detección de proteínas mediante electroforesis y *Western blot*.

La fracción proteica celular se obtuvo mediante lisis en tampón RIPA (1% NP-40, 0,5% deoxicolato sódico y 0,1% SDS en PBS 1X) en presencia de inhibidores de proteasas (1 mM PMSF y 1  $\mu\text{g/ml}$  de leupeptina, aprotinina y pepstatina) (Sigma) e inhibidores de fosfatasa (50 mM NaF y 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), durante 30 minutos a 4°C. A continuación, los lisados se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 minutos y se recogieron los sobrenadantes. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida/bis-acrilamida (8-12%) en condiciones desnaturizantes reductoras (SDS-PAGE).

Especificidad	Origen/Isotipo	Peso Molecular	Fuente
SFRP1	Conejo IgG	35 KDa	Cell Signalling
C-MYC	Ratón IgG1	62 KDa	BD Pharmingen
ICN1 VAL1744	Conejo (P)	110 KDa	Cell Signalling
TUBULINA	Ratón	50 KDa	Sigma

Especificidad	Conjugado	Origen	Fuente
IgGs ratón	Peroxidasa	Cabra	Jackson IR.
IgGs conejo	Peroxidasa	Cabra	Jackson IR.

**Tabla 3. Anticuerpos utilizados para *Western Blot*.** En la tabla superior se especifican los anticuerpos primarios, y en la inferior los anticuerpos secundarios.

Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) y se bloquearon con 5% de leche en polvo (Molico Sveltesse, Nestlé) en TBS (TrisHCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM). La incubación con los anticuerpos primarios (**Tabla 3 superior**) se realizó en TBS-T 0,1% (Tween 20, Sigma) durante toda la noche a 4°C en agitación. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T 0,1% durante 10 minutos, tras los cuales, se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (**Tabla 3 inferior**), durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad, en TBS-T 0,1% más 5% BSA (Roche). Seguidamente, se sometieron a una reacción de quimioluminiscencia con Lumi-Light Plus (Roche). La intensidad de señal se cuantificó por densitometría utilizando el programa ImageJ.

### 8. Ensayos de actividad proteolítica de las metaloproteasas ADAM.

Para determinar la actividad proteolítica de las metaloproteasas ADAM, se utilizó un péptido fluorogénico específico Mca-P-L-A-Q-A-V-Dpa-R-S-S-S-R-NH<sub>2</sub> (R&D Systems), capaz de emitir fluorescencia cuando es procesado por ADAM9, ADAM10 o ADAM17. Brevemente, se resuspendieron  $1 \times 10^6$  células en 1ml de tampón *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS; 0,137M NaCl, 5,4mM KCl, 0,25mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,3mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 4,2mM NaHCO<sub>3</sub>), se añadió el péptido fluorogénico a una concentración final de 6µM y se incubaron las células a 37°C con agitación suave en presencia de distintos estímulos: distintas concentraciones de rhSFRP1 (Sigma), GI254023X 5 µM (R&D Systems), GW280264 10 µM (Ludwig *et al.*, 2005) durante 45 minutos. Las células se centrifugaron 5 minutos a 1.500 rpm, se recogió el sobrenadante y se analizó la fluorescencia, excitando a una longitud de onda de 320nm y midiendo la fluorescencia emitida a 405nm, en un fluorímetro o espectofotómetro de fluorescencia.

### 9. Animales de experimentación.

Los animales empleados en los experimentos fueron indistintamente machos y hembras de 6-10 semanas de edad. La cría de ratones se realizó en condiciones libres de patógenos específicos (SPF; del inglés, *Specific Pathogen Free*) en la Unidad del Animalario del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", y los experimentos de trasplante tanto de líneas celulares como de leucemias primarias en ratones inmunodeficientes se llevaron a cabo en una sala con nivel de bioseguridad 2. Los ratones se mantuvieron en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y se les



administró agua y dieta estándar *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron siguiendo los protocolos del Animalario y del Comité de Ética del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa".

Los ratones empleados se detallan en la **Tabla 4**. Los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> fueron cedidos por la Dra. Paola Bovolenta (Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Madrid).

Nombre de la cepa	Mutación	Fenotipo	Referencia
<i>Sfrp1</i> <sup>-/-</sup>	<i>Knock-in</i>	Deficiencia en la expresión de <i>Sfrp1</i> .	Satoh <i>et al.</i> , 2006
129;B6- <i>Rag2</i> <sup>tm1Fwa</sup> <i>Il2rg</i> <sup>tm1Wjl</sup>	<i>Knock-out</i>	Inmunodeficiente. Deficiente en células T, B y NK.	Weijer <i>et al.</i> , 2002
NOD.Cg- <i>Prdkc</i> <sup>scid</sup> <i>Il2rg</i> <sup>tmWjl</sup> /SzJ	<i>Knock-out</i>	Inmunodeficiente. Deficiente en células T, B y NK y sistema inmune innato reducido.	Ishikawa <i>et al.</i> , 2005

**Tabla 4.** Ratones utilizados durante la experimentación.

### 9.1. Mantenimiento y genotipado de ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup>

Los cruces se realizaron entre ratones heterocigotos de unas 8 semanas de edad con el objetivo de obtener ratones *Wild-type* (wt) y *Sfrp1*<sup>-/-</sup> en la misma camada. Para el tipaje de la progenie, se extrajo ADN a partir de tejido procedente de la oreja mediante incubación con 50  $\mu$ l de tampón de digestión (100 mM NaCl, 50 mM TrisHCl pH 8, 1% SDS) y 10 mg/ml de proteinasa K (Novagen) durante 3 horas a 55°C. A continuación, se añadió 80  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y las muestras se hirvieron durante 10 minutos. El ADN extraído se amplificó mediante PCR convencional, usando oligonucleótidos específicos (**Tabla 5**). En el ensayo de PCR se incluyeron muestras de ADN control para los diferentes genotipos esperados. Posteriormente, los productos de PCR amplificados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%. Los ratones wt se identificaron por la presencia de una banda de 510 pb, y los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> por la presencia de una banda de 420 pb.

## 9.2. Modelo de xenotrasplante subcutáneo en ratones inmunodeficientes

Para el modelo de xenotrasplante de líneas celulares T-ALL, se utilizaron ratones inmunodeficientes NOD.Cg-*Prkdc<sup>scid</sup>γC<sup>-/-</sup>* (NSG) (**Tabla 4**), de edades comprendidas entre las 6 y 10 semanas. Se utilizaron las líneas tumorales HPB-ALL, DND41, CUTLL1 y JURKAT transducidas con los vectores lentivirales que contienen SFRP1-GFP o el control GFP. Las células transducidas se lavaron con PBS1X y se resuspendieron en PBS1X a una concentración de  $5-10 \times 10^6$  células/ml y se guardaron en hielo. La inyección se realizó subcutáneamente, de manera que 200μl de la preparación celular ( $1-5 \times 10^6$  células) se inyectaron en el flanco derecho de cada uno de los ratones, utilizando jeringas de 0,5ml y agujas de 25G. El crecimiento del tumor se monitorizó hasta que los tumores alcanzaron un volumen máximo de  $3,5-4 \text{ cm}^3$ , momento en el que los ratones fueron sacrificados mediante cámara de CO<sub>2</sub> y se analizó el contenido celular de los tumores. Para el cálculo del volumen tumoral se utilizó la fórmula matemática  $a^2 \times b / 2$ , siendo a y b las medidas correspondientes al largo y al ancho del tumor. La identificación de las líneas celulares se realizó con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD45 humanos (**Tabla 2**).

## 9.3. Modelo de xenotrasplante intravenoso en ratones inmunodeficientes

Para el modelo de xenotrasplante de leucemias primarias T-ALL, se utilizaron ratones inmunodeficientes *Rag2<sup>-/-</sup>γC<sup>-/-</sup>* o NOD.Cg-*Prkdc<sup>scid</sup>γC<sup>-/-</sup>* (NSG) (**Tabla 4**), de edades comprendidas entre las 6 y 10 semanas previamente irradiados a una dosis de 1,5 Gy. Los ratones se trasplantaron con  $5 \times 10^4$  -  $1 \times 10^6$  células leucémicas no transducidas o transducidas con los vectores lentivirales que contienen SFRP1-GFP o sólo GFP como control. Las células se resuspendieron en PBS 1X a una concentración de  $0,25-5 \times 10^6$  células/ml y se mantuvieron en hielo. Tras anestesiarse a los ratones utilizando isoflurano, se inyectaron 200 μl de la suspensión celular ( $5 \times 10^4$  -  $1 \times 10^6$  células) de manera intravenosa en la vena del seno retro-orbital, utilizando jeringas de 0,5 ml y agujas de 30G. La generación de la leucemia se monitorizó mediante examen físico y análisis de sangre periódicos. La extracción de sangre se realizó de la vena submandibular mediante punción con una aguja de 23G. Los ratones se sacrificaron usando el criterio de punto final mediante cámara de CO<sub>2</sub> y los linfoblastos presentes en los principales órganos linfoides y no linfoides fueron analizados por citometría de flujo. La identificación de las células leucémicas se realizó con anti-CD45 humano (**Tabla 2**).

## 10. Secuenciación de leucemias primarias T-ALL.

### 10.1. Secuenciación del receptor *NOTCH1*: Secuenciación de *Sanger*

Con el objetivo de identificar mutaciones presentes en *NOTCH1*, el ADN procedente de leucemias primarias de pacientes se sometió a ensayos de secuenciación utilizando los oligonucleótidos mostrados en la **Tabla 5**, estos oligonucleótidos eran específicos para distintos exones del gen *NOTCH1*.

### 10.2. *Next Generation Sequencing* de *SFRP1*

Se secuenció el exoma completo de 23 muestras primarias de leucemias T-ALL mediante *Agilent SureSelect Human 51 Mb All Exon V4 kit* (Agilent Technologies). Posteriormente, se analizó la presencia de mutaciones en el gen *SFRP1* en las muestras analizadas.

### 10.3. Secuenciación de ADN metilado

Las muestras de ADN genómico (1-2 µg) procedentes de 23 muestras primarias de T-ALL y 10 muestras de células T control se trataron con ADN λ sin metilar (5ng de ADN λ por µg de ADN genómico) (Promega). El ADN se fragmentó mediante sonicación usando un sonicador Covaris E220 y se seleccionaron los fragmentos de 150-300pb mediante AMPure XP beads (Agencourt Bioscience Corp.). Las librerías de ADN genómico se realizaron usando Illumina TruSeq Sample Preparation kit (Illumina Inc.). A continuación el ADN se trató con bisulfito de sodio usando EpiTaxy Bisulfite kit (Qiagen), se realizaron dos rondas de tratamiento para asegurar una alta tasa de conversión. El ADN se amplificó mediante 7 ciclos de PCR usando PfuTurboCx Hotstart DNA polymerase (Stratagene). La secuenciación del ADN se realizó a través de Illumina 4Hi-Seq 2000. La diferencia en metilación entre los grupos células T normales y T-ALL se calculó mediante Mann-Whitney-Wilcoxon.

Ensayo	Diana	Secuencia de nucleótidos
Clonaje <i>SFRP1</i>	<i>SFRP1</i>	F-5'-CCGGATCCCGCCACCATGGGGCATCGGGCGCAGC-3' R-5'-CCCTCGAGTCACTTAAACACGGACTG-3'
Genotipado de ratones <i>Sfrp1</i> <sup>-/-</sup>	<i>Sfrp1</i> Wt  <i>Sfrp1</i> Mutado	F-5'-ATTGGTTAACTGCGCGGCTGACT-3' R-5'-GACTGGAAGCTCACGTAGTCGT-3'  F-5'-ATTGGTTAACTGCGCGGCTGACT-3' R-5'-TGCCAAAAGACGGCAATATGGTG-3'
Secuenciación de <i>NOTCH1</i>	Exón 26  Exón 27  Exón 28  Exón 34 TAD  Exón 34 PEST	F-5'-GCTGAGGGAGGACCTGAACTTGG-3' R-5'-CCTGAGCTGGAATGCTGCCTCTA-3'  F-5'-CATGGGCCTCAGTGTCTCT-3' R-5'-TAGCAACTGGCACAACAGC-3'  F-5'-GCGTAGCCGCTGCCTGAT-3' R-5'-CAGACTCCCGGTGAGGATGC-3'  F-5'-GCTGGCCTTTGAGACTGG-3' R-5'-CTCCTGGGGCAGAATAGTGT-3'  F-5'-ACAGATGCAGCAGCAGAACC-3' R-5'-CCTGGGGCCAGATAAACAGTACA-3'

**TABLA 5.** Oligonucleótidos empleados para el clonaje de *SFRP1*, el tipaje de los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> y la secuenciación de *NOTCH1*. Se indica el tipo de ensayo, el gen diana frente al que se diseñaron los oligonucleótidos y su secuencia. La letra F se refiere al oligonucleótido sentido y la letra R al oligonucleótido antisentido.

# RESULTADOS

## 1. Relevancia funcional de Sfrp1 durante el desarrollo fisiológico de los linfocitos T.

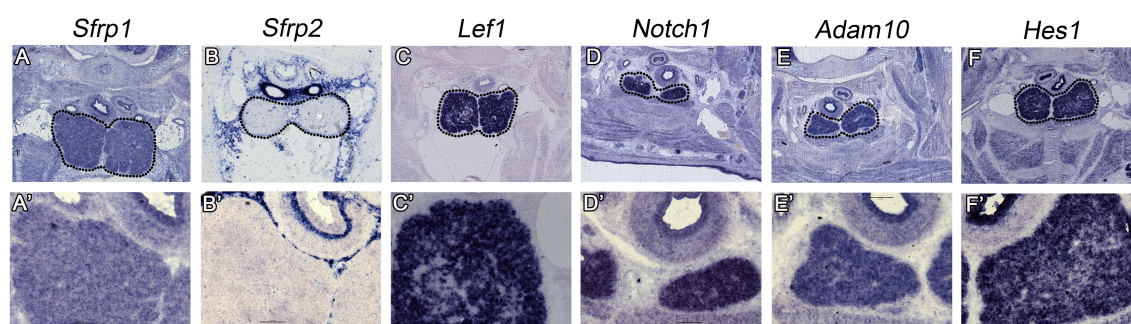
Estudios recientes demuestran la implicación de los factores Sfrp1, Sfrp2 y Sfrp3, en la inhibición de la vía de Notch durante la neurogénesis de la retina de ratón (Esteve *et al.*, 2011a), así como en líneas celulares epiteliales humanas (Oldefest *et al.*, 2015). Dichos estudios sugieren la posibilidad de que el mismo mecanismo de regulación de Notch, por modulación negativa de Adam10 y Adam17, pueda estar implicado en otros sistemas como el hematopoyético y, en concreto, en el proceso de diferenciación de los linfocitos T en el timo. Por tanto, el primer objetivo de este trabajo fue estudiar la función de los factores Sfrp durante el desarrollo fisiológico de los linfocitos T, así como la posibilidad de que estos factores regulen la vía de Notch durante este proceso.

### 1.1. Caracterización de la expresión de Sfrp1 y Sfrp2 en el timo de ratón: expresión selectiva de Sfrp1.

Para determinar si Sfrp1 y Sfrp2 podían estar implicados en el desarrollo de los linfocitos T, lo primero que quisimos determinar fue si los factores Sfrp se expresan en el timo. Para ello, analizamos el patrón de expresión del ARN mensajero (ARNm) de *Sfrp1* y *Sfrp2* mediante hibridación *in situ* con sondas específicas en timos embrionarios de 15,5 días de gestación (E15,5) (**Figura 10A**) procedentes de ratones C57BL/6 normales (*Wild-type*, wt), en los que se ha iniciado el proceso de maduración de los linfocitos T. Observamos que *Sfrp1* se expresaba en el timo con una distribución muy homogénea, sin encontrar variaciones significativas entre las distintas regiones intratímicas. Al realizar la hibridación de la sonda frente a *Sfrp2* (**Figura 10B**), no encontramos expresión en el timo; sin embargo, pudimos observar que los tejidos que se encontraban a su alrededor expresaban *Sfrp2*. Por este motivo, nuestro trabajo se centrará únicamente en el estudio de la función de Sfrp1 en el timo de ratón, al ser el único factor de los estudiados que se expresa en este órgano.

Con el objetivo de analizar la activación de las vías de señalización de Wnt y Notch en los timos en los que se expresa Sfrp1, las mismas muestras se analizaron con sondas dirigidas al ARNm de diferentes proteínas de ambas rutas. Mediante el uso de una sonda frente a *Lef1*, observamos que la vía de Wnt se encontraba activa en el timo

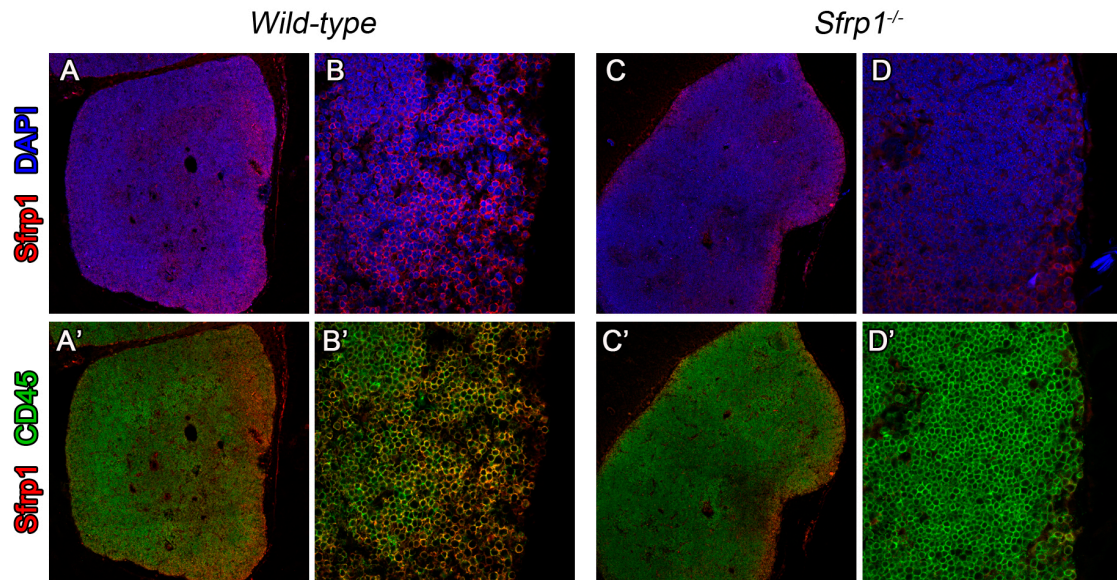
a E15,5 (**Figura 10C**), y también que había una gran expresión del receptor *Notch1* (**Figura 10D**) y de la metaloproteasa *Adam10* (**Figura 10E**), elementos imprescindibles para la activación de la vía de Notch. Esta activación se confirmó mediante hibridación con una sonda frente a *Hes1* (**Figura 10F**), gen diana de Notch1. Aunque no pudimos observar ninguna diferencia en la expresión de estos factores entre las distintas regiones intratímicas, debido a que a E15,5 aún no están bien definidas, pudimos comprobar que ambas vías de señalización, Wnt y Notch, se encuentran activas a la vez en el timo embrionario de ratón.



**Figura 10. Expresión por hibridación *in situ* de genes implicados en las vías de Wnt y de Notch en el timo embrionario de ratón.** Secciones de criostato de timo de ratón de 15,5 días de gestación hibridadas con sondas específicas para *Sfrp1* (A), *Sfrp2* (B), *Lef1* (C), *Notch1* (D), *Adam10* (E) y *Hes1* (F). (A-F) Vista general de la localización del timo, señalado con línea punteada. (A'-F') Vista en detalle del timo hibridado con las distintas sondas.

Una vez observamos que *Sfrp1* se estaba expresando en el timo de ratón, quisimos determinar la localización de la proteína en este órgano. Para ello, llevamos a cabo ensayos de inmunohistoquímica con anticuerpos frente a la proteína *Sfrp1* en timos neonatales de ratones wt, edad a la que las distintas regiones intratímicas se encuentran bien definidas y el proceso de diferenciación se ha completado (**Figura 11A y B**). La tinción reveló que *Sfrp1* se expresa tanto en la médula como en la corteza del timo de ratones de un día de edad, pero en este caso donde más expresión de *Sfrp1* encontramos fue en la región SCZ. Además, al realizar la tinción de *Sfrp1* en paralelo con el marcador de células hematopoyéticas CD45, pudimos comprobar que las células positivas para *Sfrp1* eran los timocitos situados en la región sub-capsular. Para confirmar la especificidad de la tinción se utilizó como control un modelo de ratón deficiente en la expresión de *Sfrp1* (*Sfrp1*<sup>-/-</sup>) (Sato *et al.*, 2006), donde no se observó tinción con *Sfrp1* (**Figura 11C y D**).





**Figura 11. La proteína Sfrp1 se expresa principalmente en los timocitos de la región SCZ del timo de ratón.** Secciones de criostato de timo de ratones neonatos teñidos con anticuerpos frente a Sfrp1 (rojo) y CD45 (verde). DAPI fue usado para la tinción nuclear (azul). (A,C) Vista general del timo. (B, D) Expresión de Sfrp1 y CD45 en la región SCZ.

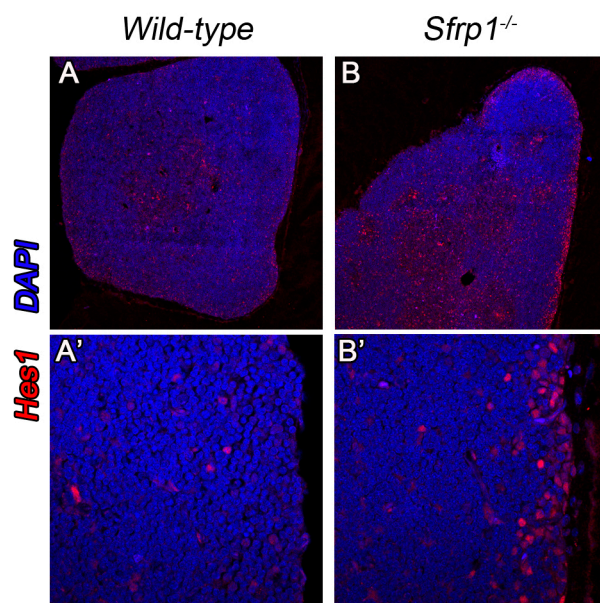
Como conclusión, estos datos indican que la expresión Sfrp1 en el timo embrionario de ratón, que contiene mayoritariamente progenitores DN y algunos CD8ISP, es muy homogénea. Sin embargo, en timos neonatales donde la mayor parte de las células se encuentran en el estadio DP, la expresión de Sfrp1 se localiza principalmente en las células T de la región SCZ, región en la que se encuentran los timocitos DN3. Por tanto, Sfrp1 podría tener una función relevante durante el desarrollo temprano de los linfocitos T de ratón, en concreto, de las células DN.

## 1.2. Sfrp1 regula la activación de Notch1 en el timo de ratón.

La observación de que Sfrp1 se expresa en el timo de ratón sugiere que su función podría estar relacionada con la regulación de la vía de Notch1 en los timocitos en desarrollo. Se ha descrito que la expresión de Notch1 está finamente regulada durante la diferenciación de las células T de ratón y aumenta progresivamente desde los progenitores más tempranos hasta el estadio previo al proceso de selección- $\beta$  (Taghon *et al.*, 2006; Yashiro-Ohtani *et al.*, 2009) (**Figura 5**). Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue averiguar si Sfrp1 podría regular la vía de Notch1 *in vivo*. Para ello, utilizamos timos de ratones wt y Sfrp1<sup>-/-</sup> de un día de edad en los que analizamos el estado de activación



de Notch1 mediante inmunohistoquímica de una de sus principales dianas, Hes1 (**Figura 12**). Observamos que había mayor expresión de Hes1 en el timo de los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup>, siendo esta regulación más evidente en la región SCZ, donde encontramos una mayor expresión de Sfrp1 y donde se encuentran los timocitos DN3 (**Figura 2**). Estos datos, apoyan la hipótesis de que Sfrp1 podría inhibir la vía de Notch1 en el timo de ratón, induciéndose en su ausencia un incremento en la expresión de Hes1, uno de los efectores de la vía. Por tanto, nuestros datos sugieren que Sfrp1 regula la activación de Notch en la región SCZ del timo de ratón, donde tiene lugar el proceso de selección-β (**Figura 2**).



**Figura 12. Sfrp1 regula la activación de la vía de Notch1 en el timo de ratón.** Secciones de criostato de timo de ratones neonatos tratadas con un anticuerpo frente a Sfrp1 (rojo). DAPI fue usado para la tinción nuclear (azul). (A,B) Vista general del timo de ratones *Wild-type* o *Sfrp1*<sup>-/-</sup> respectivamente. (A', B') Expresión de Sfrp1 en la región SCZ del timo de ratones *Wild-type* o *Sfrp1*<sup>-/-</sup> respectivamente.

### 1.3. Sfrp1 regula la diferenciación de los linfocitos T durante el desarrollo intratímico de ratón.

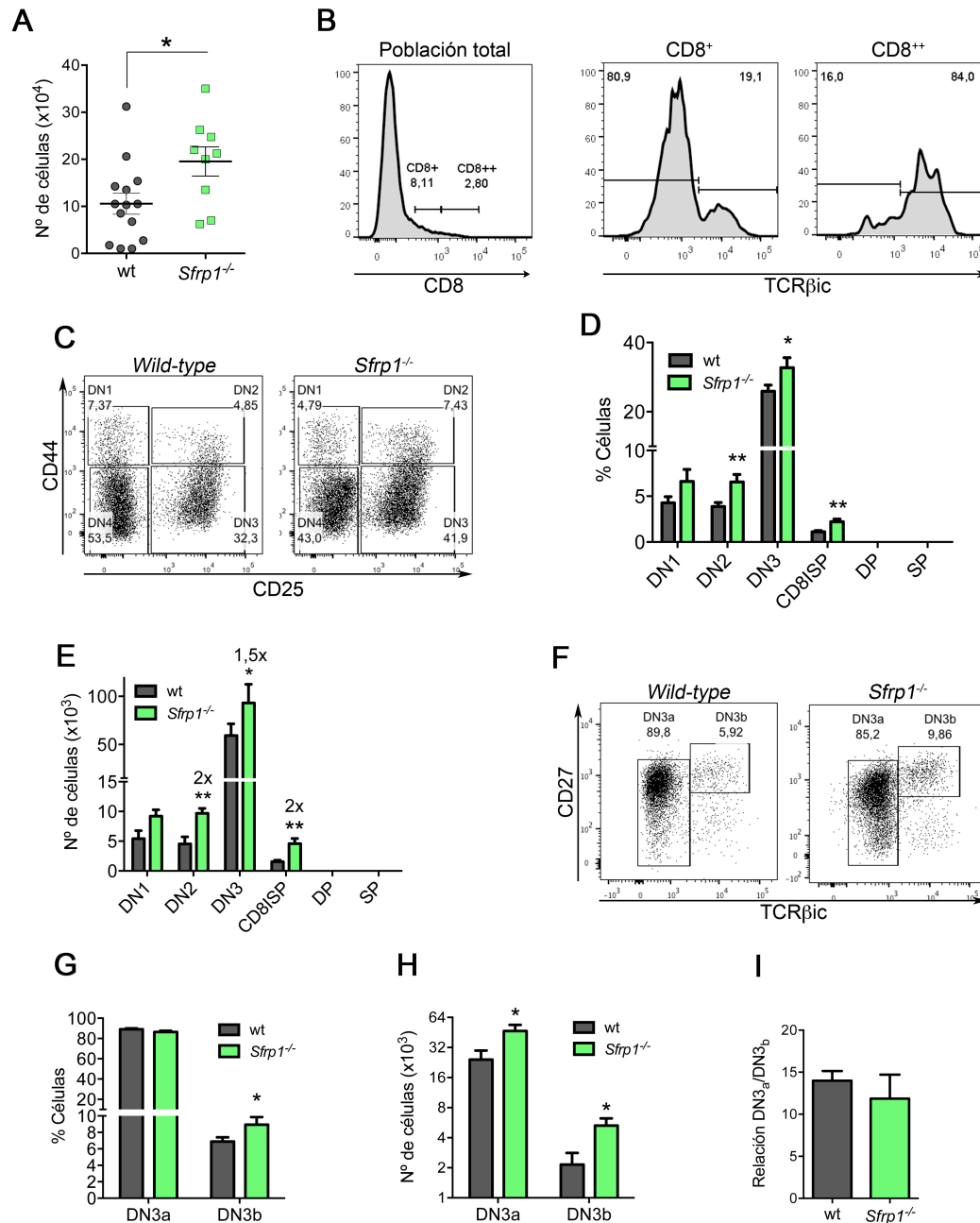
El estudio de los niveles de expresión de Notch1 durante la diferenciación intratímica de los linfocitos T (**Figura 5**) sugiere la existencia de mecanismos de regulación transcripcional que aseguren una alta expresión durante los primeros estadios DN y una disminución en los progenitores que sobreviven a la selección-β (Taghon *et al.*, 2006). Sin embargo, los mecanismos por los cuales disminuye la activación de la vía de Notch1 inmediatamente después de la selección-β no están claros, ya que la expresión en membrana del receptor sigue siendo elevada en los timocitos DN4 y CD8ISP, disminuyendo posteriormente en el estadio DP (Fiorini *et al.*, 2009). En consecuencia, nos preguntamos si el factor Sfrp1 podría ser un modulador de

la señalización mediada por Notch1 durante la diferenciación de los linfocitos T. Para abordar este objetivo, se analizó el proceso de diferenciación de los linfocitos T en distintas etapas de la vida, tanto embrionaria como postnatal, de ratones wt y *Sfrp1*<sup>-/-</sup>.

### 1.3.1. Implicación de *Sfrp1* en la generación de linfocitos T durante el desarrollo embrionario.

Con el objetivo de estudiar la posible implicación de *Sfrp1* durante el proceso de diferenciación de los linfocitos T en la vida embrionaria, analizamos las poblaciones presentes en el timo de embriones wt y *Sfrp1*<sup>-/-</sup> de 15,5 días de gestación, cuando el timo está compuesto en su mayoría por células progenitoras DN y una pequeña población (<2%) de timocitos CD8ISP (Vaillant *et al.*, 2002). Nuestros datos mostraron que los timos procedentes de los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> presentaban un incremento de dos veces en el número total de células (**Figura 13A**), al compararlos con los timos procedentes de los ratones wt de la misma edad. Este incremento se correlacionaba con un aumento en la proporción de las poblaciones DN2 y DN3 (**Figura 13C y D**), que preceden al proceso de selección- $\beta$ , y de la población post-selección- $\beta$  CD8ISP (**Figura 13B y D**), así como en los números absolutos de las mismas (**Figura 13E**). Por el contrario, la población DN1, que incluye a los progenitores más inmaduros presentes en el timo, no se vio incrementada de forma significativa (**Figura 13D y E**), y tampoco observamos variaciones significativas en los números de células DN4 (datos no mostrados). Considerando que el criterio fenotípico utilizado para definir la población DN4 en nuestro análisis (**Figura 13C**) no excluye la presencia de células de linaje no-T, en adelante no consideraremos esta subpoblación en nuestro estudio.

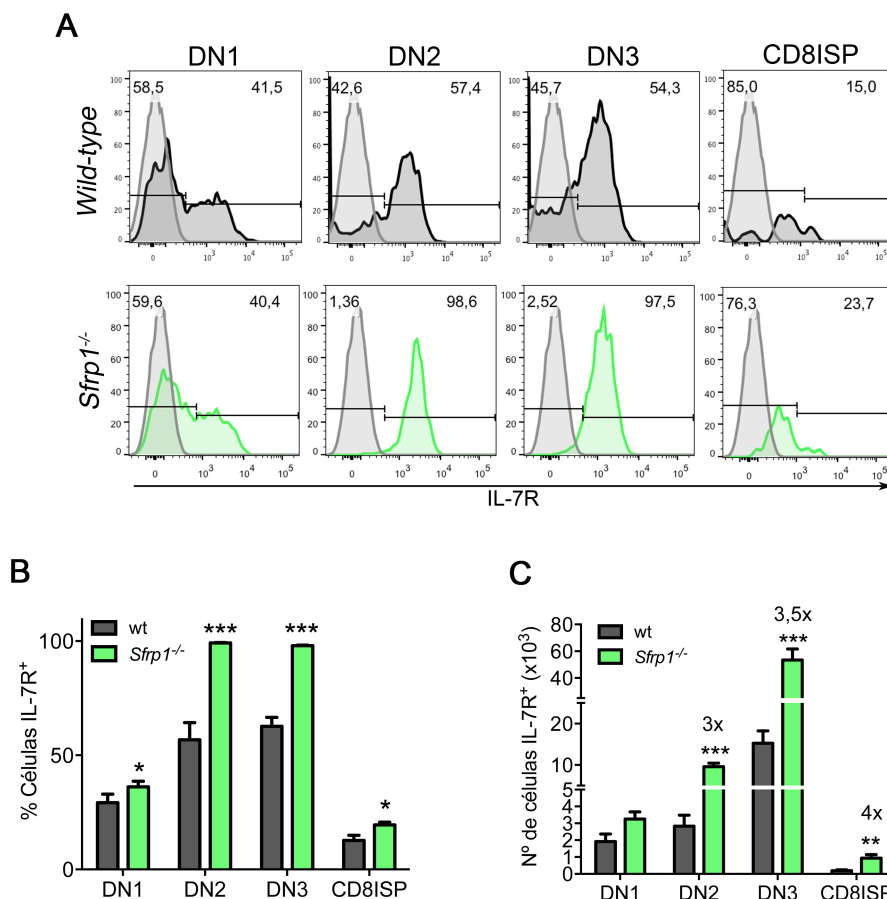
El incremento de la población DN3 en los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> sugiere que *Sfrp1* podría ejercer una función específica durante el proceso de selección- $\beta$ , que acontece en este estadio. Este proceso induce la expansión dependiente de Notch1 de los timocitos DN3 que han sido seleccionados y su progresión al siguiente estadio madurativo (Maillard *et al.*, 2006). En consecuencia, el estadio DN3 incluye dos subpoblaciones, una población previa a la selección- $\beta$  y con niveles bajos del receptor CD27, denominada DN3<sub>a</sub>, y una segunda población, DN3<sub>b</sub>, que ya ha sufrido la selección- $\beta$  y posee niveles altos del receptor CD27 (Taghon *et al.*, 2006). Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue analizar ambas subpoblaciones en los embriones de 15,5 días de gestación.



**Figura 13. La deficiencia de *Sfrp1* induce un incremento de las poblaciones DN2, DN3 y CD8ISP en embriones de 15,5 días de gestación.** (A) Número de células totales presentes en el timo de embriones de 15,5 días de gestación, los timos analizados proceden de ratones wt o  $Sfrp1^{-/-}$ . (B) Análisis por citometría de flujo de las poblaciones de timocitos CD8<sup>+</sup> (izquierda), y de los niveles de TCRβ de cada sub-población CD8<sup>+</sup> (derecha). Los números indican el porcentaje de cada población. (C) Análisis por citometría de flujo de las poblaciones de timocitos DN, definidas por los marcadores CD44 y CD25, presentes en el timo de los ratones analizados. Los números indican el porcentaje de cada población. Porcentajes (D) o números absolutos (E) de las poblaciones indicadas presentes en el timo de los ratones wt o  $Sfrp1^{-/-}$ . (F) Análisis por citometría de flujo, porcentajes (G) y números absolutos (H) de las poblaciones DN3<sub>a</sub> y DN3<sub>b</sub>, definidas por los marcadores CD27 y TCRβ, en los ratones indicados. Las barras representan la media  $\pm$  SEM del análisis de al menos 9 embriones de cada grupo. Se muestra la significación estadística de los resultados (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

No encontramos diferencias significativas en la proporción de células DN3<sub>a</sub> en los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> respecto a los ratones wt, pero observamos que la proporción de células DN3<sub>b</sub> estaba ligeramente aumentada (1,5x) en los primeros (**Figura 13F y G**). Sin embargo, ambas sub-poblaciones DN3 estaban incrementadas en números absolutos en los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> (**Figura 13H**), por lo que no encontramos diferencias significativas en la relación de células DN3<sub>b</sub> respecto a las DN3<sub>a</sub> entre ambos grupos (**Figura 13I**). Estos datos indican que *Sfrp1* podría regular el número de progenitores en estadios madurativos previos a la selección-β, aunque no parece afectar significativamente la eficiencia de este proceso en la transición DN3<sub>a</sub>-DN3<sub>b</sub>.

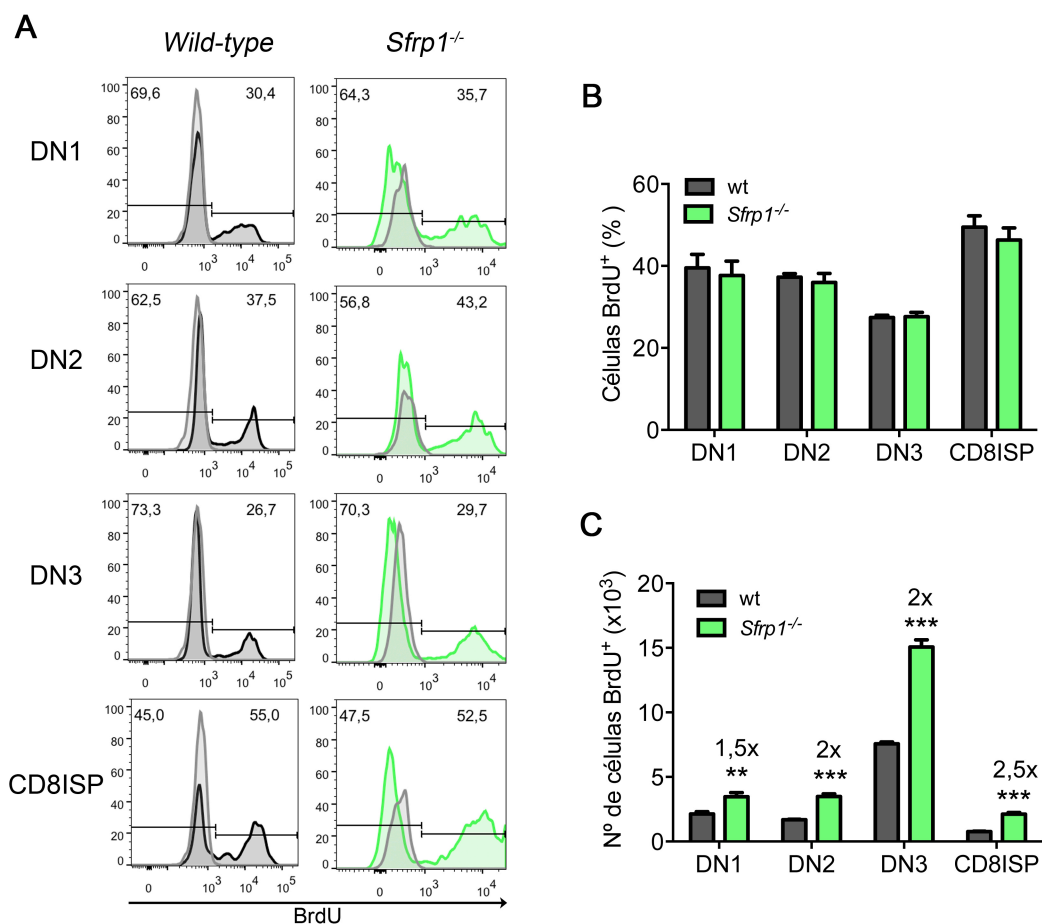
Durante el desarrollo intratímico, la proliferación y expansión celular de los progenitores tempranos que no han sufrido todavía el proceso de selección-β está regulada por la expresión del IL-7R, cuya transcripción se regula, a su vez, por la activación de la vía de Notch1 (González-García *et al.*, 2009). Por tanto, quisimos analizar si la deficiencia de *Sfrp1* podía tener un impacto sobre la proliferación de las poblaciones DN a través de la inducción de la expresión del IL-7R. Para ello, analizamos mediante citometría de flujo la expresión del IL-7R en las distintas poblaciones presentes en los timos de embriones de E15,5 de ratones wt y *Sfrp1*<sup>-/-</sup> (**Figura 14A**). Estos análisis revelaron que la ausencia de *Sfrp1* inducía un aumento específico en la proporción de células que expresaban el IL-7R en los estadios DN1, DN2, DN3 y CD8ISP (**Figura 14B**), que correlacionaba con un aumento de los números absolutos de células IL-7R<sup>+</sup> en todas ellas, excepto en la población más inmadura DN1, donde el aumento no fue significativo (**Figura 14C**), lo que concuerda con el hecho de que otras citoquinas, además de la IL-7, participan en la expansión de esta subpoblación *in vivo*. Estos datos demuestran que la ausencia de *Sfrp1* promueve un incremento en la expresión del IL-7R en los estadios anteriores (DN) y posteriores (CD8ISP) al proceso de selección-β presentes en el timo embrionario de 15,5 días de gestación, que se correlaciona con la expansión de estas poblaciones. Considerando que Notch1 regula la expresión del IL-7R tanto en humanos (González-García *et al.*, 2009) como en ratón (Mosquera *et al.*, en preparación), podemos concluir que *Sfrp1* participa en la regulación de la expresión de IL-7R, probablemente mediante el control de la activación de Notch1.



**Figura 14. La ausencia de *Sfrp1* incrementa la expresión del IL-7R en los estadios DN1, DN2, DN3 y CD8ISP.** (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión del IL-7R en las distintas poblaciones del timo de embriones de 15,5 días de gestación de ratones wt o *Sfrp1*<sup>-/-</sup>. Los histogramas sombreados en gris representan la tinción con un anticuerpo isotípico irrelevante. Se indica el número de células positivas. Porcentaje (B) y números absolutos (C) de células positivas para la expresión del IL-7R presentes en el timo de los ratones indicados. Las barras representan la media  $\pm$  SEM del análisis de al menos 9 embriones de cada grupo. Se muestra la significación estadística de los resultados (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Para analizar si el aumento observado en la expresión del IL-7R se traducía en un incremento de la proliferación de las poblaciones presentes en el timo de los embriones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> en respuesta a la IL-7 endógena, realizamos un ensayo de incorporación de BrdU. Para ello, se inyectó de manera intraperitoneal BrdU en hembras wt o *Sfrp1*<sup>-/-</sup> de 15,5 días de gestación y transcurrida una hora, se extrajeron los lóbulos tímicos de los embriones. Se analizó mediante citometría de flujo la incorporación de BrdU con el objetivo de identificar las células que habían proliferado durante este periodo (**Figura 15A**). No observamos diferencias significativas entre los embriones wt y *Sfrp1*<sup>-/-</sup> ni en el porcentaje de células que incorporaron BrdU (**Figura 15B**), ni en el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, analizadas por tinción con

7AAD (datos no mostrados), en ninguna de las subpoblaciones analizadas, lo que sugiere que las células de ambos grupos de ratones presentan la misma tasa proliferativa a E15,5. Conforme a la mayor celularidad de todas las subpoblaciones presentes en el timo de los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup>, observamos un incremento significativo de los números absolutos de células que han incorporado BrdU en estas subpoblaciones frente a las subpoblaciones control (**Figura 15C**). Estos datos sugieren que la expansión que observamos se produjo en momentos del desarrollo anteriores a E15,5.

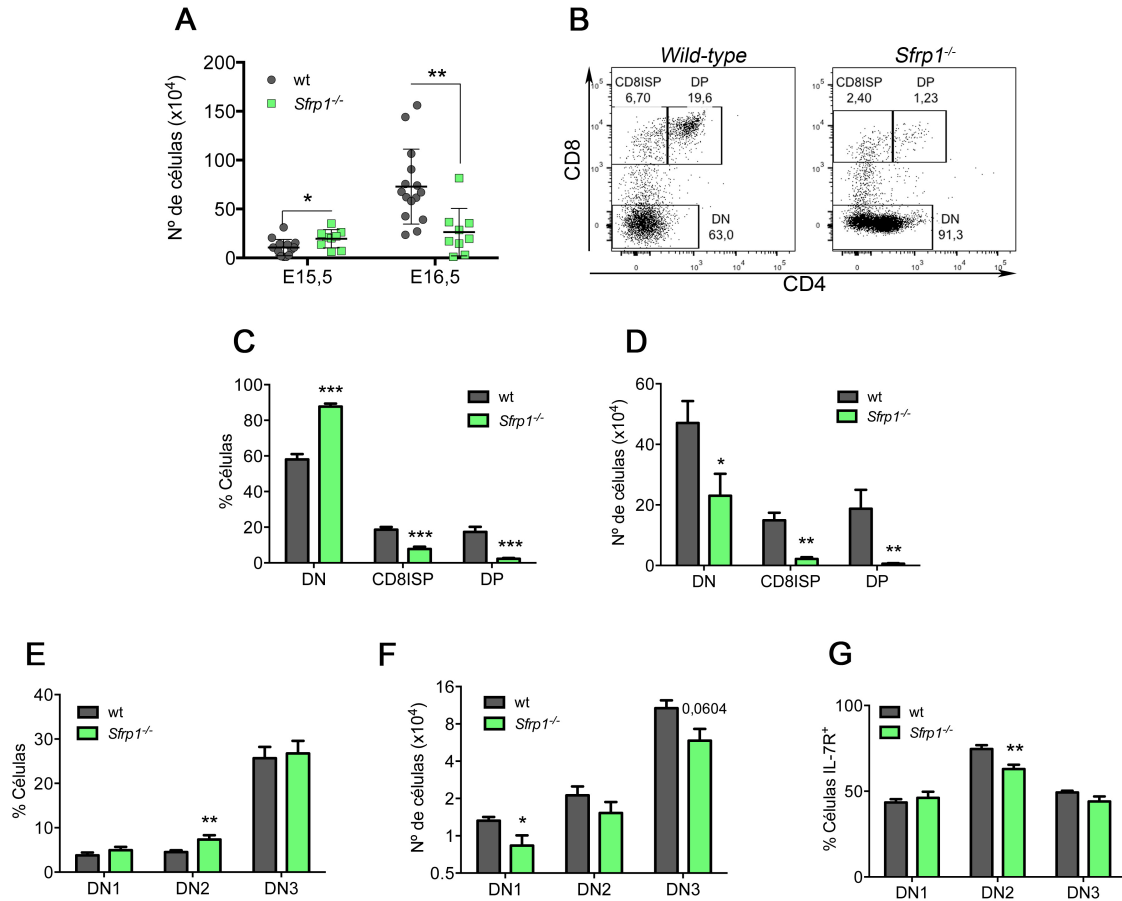


**Figura 15. La deficiencia de *Sfrp1* no incrementa la proliferación de los timocitos de embriones de 15,5 días de gestación.** (A) Análisis mediante citometría de flujo de la incorporación de BrdU tras un pulso de una hora, en las distintas poblaciones del timo de embriones wt o *Sfrp1*<sup>-/-</sup> de 15,5 días de gestación. Los histogramas muestran la incorporación basal con un anticuerpo isotípico irrelevante. Se indica el porcentaje de células positivas. Porcentaje (B) y números (C) de células que han incorporado BrdU presentes en las subpoblaciones indicadas presentes en el timo de ratones wt o *Sfrp1*<sup>-/-</sup>. Las barras representan la media  $\pm$  SEM del análisis de al menos 6 embriones de cada grupo. Se muestra la significación estadística (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



Nuestro siguiente objetivo fue determinar si los efectos que veíamos sobre las poblaciones DN en los embriones de 15,5 días de gestación se mantenían en momentos más avanzados del desarrollo ontogénico. Para ello, analizamos el timo de embriones de 16,5 días, momento del desarrollo en el cuál se produce una enorme expansión de las células CD8ISP que han sido seleccionadas y su progresión al estadio DP (Xiao *et al.*, 2003). En contra del incremento celular observado en los timos de los embriones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> de 15,5 días de gestación, los timos de ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> de 16,5 días presentaban una reducción de 2,5 veces en el número total de timocitos, respecto a los animales wt (**Figura 16A**). Conforme a estos datos, observamos que los números totales de timocitos wt se incrementaban 5 veces en un día (de E15,5 a E16,5), coincidiendo con la enorme expansión que se induce en las células que han sobrevivido al proceso de selección- $\beta$  (Xiao *et al.*, 2003). Por el contrario, los números de timocitos *Sfrp1*<sup>-/-</sup> se mantuvieron constantes de E15,5 a E16,5, lo que sugiere que la ausencia de *Sfrp1* resulta en una deficiente expansión celular tras el proceso de selección- $\beta$ . Conforme a esta posibilidad, observamos que la transición CD8ISP-DP durante la progresión de E15,5 a E16,5 se acompañaba de una expansión celular de 50 veces en los timos wt, frente a 2 veces en los timos mutantes. Como resultado, observamos una disminución especialmente significativa (50x) de los números absolutos de timocitos CD8ISP y DP post-selección- $\beta$  en los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> (**Figura 16B, C y D**). Aunque esta disminución se acompañaba del consiguiente incremento en la proporción de progenitores DN (**Figura 16C**), los números absolutos de timocitos DN también disminuyeron un 50% en los animales mutantes, respecto a los wt (**Figura 16D**). Esta disminución fue estadísticamente significativa exclusivamente en la población DN1, reflejando una pérdida mayoritaria de estos progenitores (**Figura 16E y F**) que se acompañaba de un incremento en la proporción de células DN2 (**Figura 16C**), lo que sugiere una diferenciación acelerada de los primeros. En contra de los datos obtenidos en animales de 15,5 días de gestación, la pérdida de *Sfrp1* no se reflejó en un incremento de las proporciones de células IL-7R<sup>+</sup> en las distintas subpoblaciones del timo de embriones de 16,5 días, en comparación con las correspondientes poblaciones control (**Figura 16G**). Estos resultados sugieren que los timos de los embriones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> sufren una pérdida selectiva de células DN IL-7R<sup>+</sup> durante la transición ontogénica de E15,5 a E16,5. En conjunto, nuestros datos indican que la ausencia de *Sfrp1* provoca la pérdida de células progenitoras DN que expresan IL-7R en momentos anteriores al proceso de selección- $\beta$  y, posteriormente, una fuerte inhibición de la expansión de las poblaciones CD8ISP y DP

post-selección- $\beta$ , lo que se refleja en un bloqueo en la transición DN-DP que acontece por primera vez en la ontogenia durante la progresión de E15,5 a E16,5.

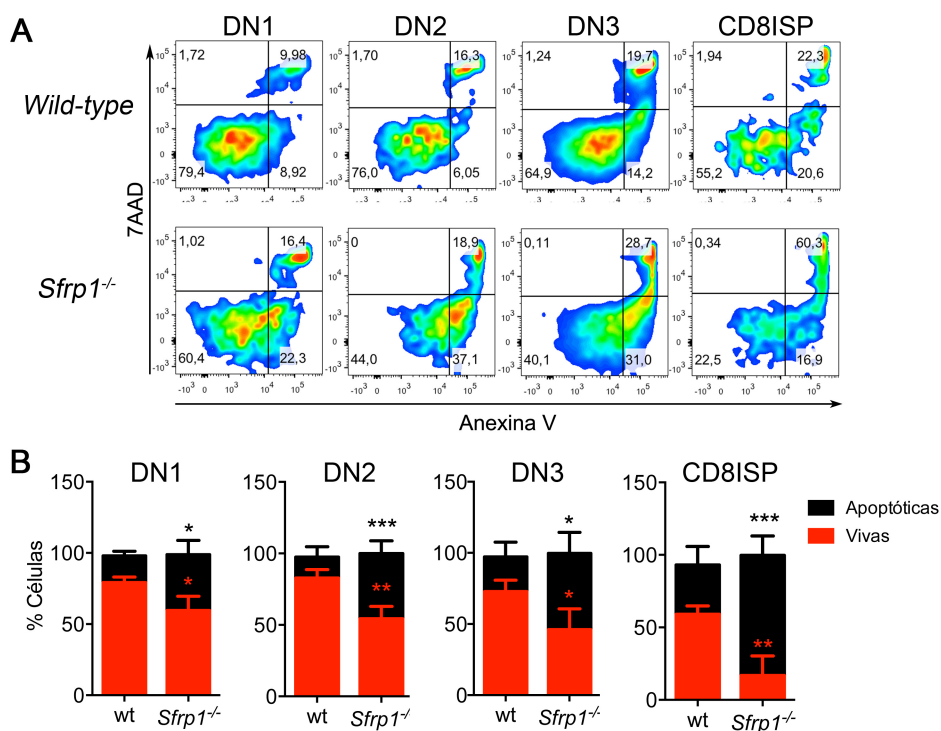


**Figura 16. La deficiencia de *Sfrp1* impide la generación de las poblaciones post-selección- $\beta$  CD8ISP y DP en embriones de 16,5 días de gestación.** (A) Número de células totales presentes en el timo de embriones de 15,5 y 16,5 días de gestación de ratones wt o *Sfrp1*<sup>-/-</sup>. (B) Análisis por citometría de flujo del porcentaje (C) y número de células (D) de las poblaciones presentes en el timo de embriones wt o *Sfrp1*<sup>-/-</sup> de E16,5. Las poblaciones fueron definidas por los marcadores CD4 y CD8. Los números indican el porcentaje de células de cada población. Porcentaje (E) y números absolutos (F) de las distintas poblaciones de células DN (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>), definidas por los marcadores CD44 y CD25, presentes en el timo de embriones de E16,5. (G) Porcentaje de células IL-7R<sup>+</sup> presentes en las distintas poblaciones de células DN, en embriones de E16,5. Las barras representan la media  $\pm$  SEM del análisis de al menos 9 embriones de cada grupo. Se muestra la significación estadística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

La disminución de los números de timocitos en los embriones deficientes en *Sfrp1* podría ser debida a una inhibición de la supervivencia celular. Con el objetivo de analizar esta posibilidad, estudiamos la apoptosis de las distintas poblaciones presentes en el timo de los embriones de 15,5 días de gestación. El análisis por citometría de flujo mediante el marcaje de las células con Anexina V y 7AAD (**Figura 17A**), reveló que la



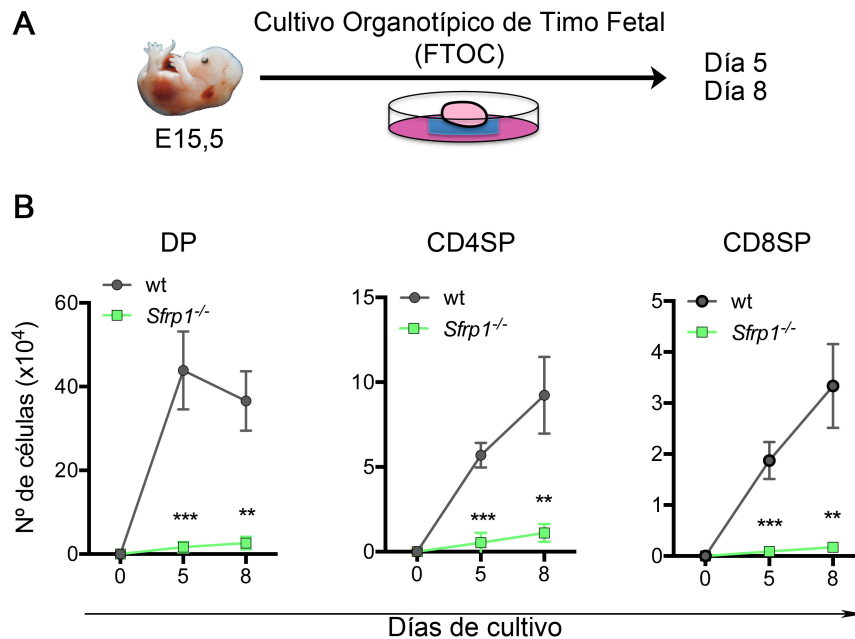
ausencia de *Sfrp1* provocaba un aumento significativo del porcentaje de células apoptóticas incluidas en todas las poblaciones presentes en el timo de los embriones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> (**Figura 17B**). Este efecto afectaba de forma más evidente a la población de timocitos CD8ISP, en la que observamos una mayoría de células apoptóticas (>80%), lo que corrobora que el defecto en supervivencia celular es más acusado en las células que han sufrido el proceso de selección-β.



**Figura 17. La ausencia de *Sfrp1* incrementa la apoptosis celular en los estadios DN1, DN2, DN3 y CD8ISP.** (A) Análisis por citometría de flujo de células apoptóticas definidas por la tinción con 7AAD y Anexina V en las distintas poblaciones del timo de embriones wt o *Sfrp1*<sup>-/-</sup> de 15,5 días de gestación. Los números indican el porcentaje de células de cada población. (B) Porcentajes de células vivas y apoptóticas presentes en el timo de los ratones indicados en (A). Las barras representan la media ± SEM del análisis de al menos 5 embriones de cada grupo. Se muestra la significación estadística (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

Los timocitos CD8ISP son los precursores inmediatos de las células DP en las que se induce por primera vez la expresión del receptor TCRαβ a día 17 de desarrollo (Xiao *et al.*, 2003), por lo que nuestro siguiente objetivo fue analizar de forma directa el efecto causado por la ausencia de *Sfrp1* sobre la supervivencia y maduración de las células CD8ISP recién generadas, utilizando cultivos organotípicos de timo fetal (FTOC). Para ello, aislamos timos embrionarios de E15,5 procedentes de ratones wt o *Sfrp1*<sup>-/-</sup> y analizamos su progenie a diferentes días de cultivo (**Figura 18A**). Comprobamos que,

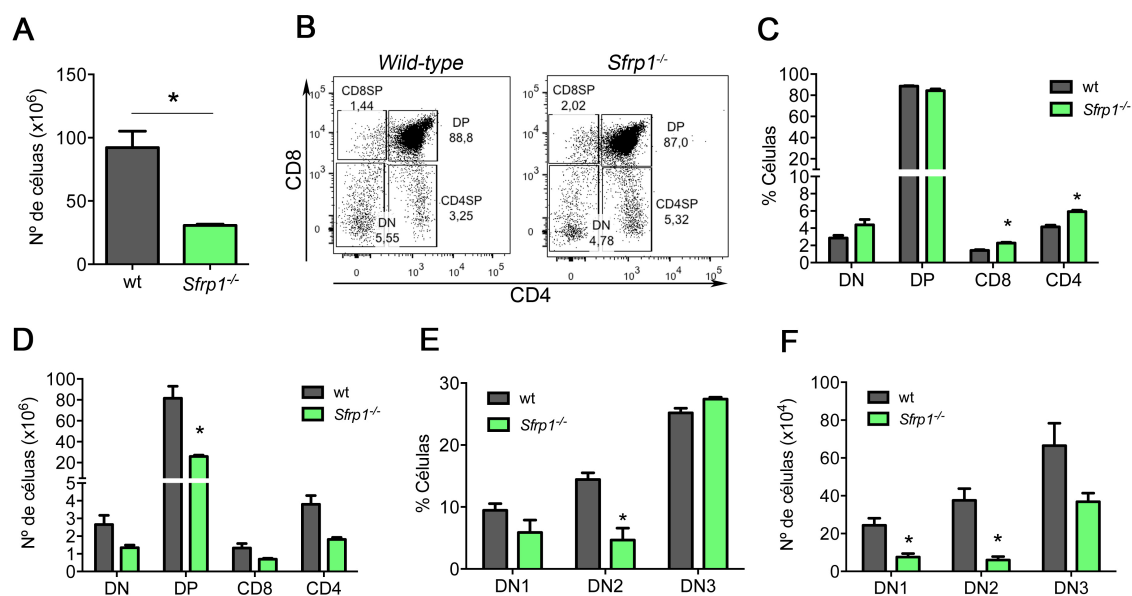
como se ha mostrado en la Figura 13, la celularidad de los lóbulos tímicos era mayor en los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> que en los wt (2x), debido a un mayor número de células DN en los estadios pre-selección-β. Sin embargo, durante el cultivo, los lóbulos correspondientes a los embriones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> mostraron hasta 10 veces menos células totales que los lóbulos de los ratones wt (datos no mostrados). Este descenso correlacionaba con una bajada muy significativa en el número de células derivadas de la población CD8ISP que progresa a los estadios post-selección-β DP (25x), CD4SP (10x) y CD8SP (20x) (**Figura 18B**). Por tanto, la ausencia de *Sfrp1* impide la eficiente progresión tras el proceso de selección-β lo que resulta en la deficiente generación de timocitos con receptores maduros TCRαβ (DP, CD4SP y CD8SP), probablemente debida al incremento en la apoptosis de sus progenitores inmediatos CD8ISP.



**Figura 18. La deficiencia en *Sfrp1* impide la generación de timocitos DP y SP en FTOC de embriones de 15,5 días de gestación.** (A) Representación esquemática de cultivo organotípico de timo fetal (FTOC). (B) Número de timocitos DP, CD4SP y CD8SP obtenidos de los lóbulos procedentes de ratones wt o *Sfrp1*<sup>-/-</sup> a los días de cultivo indicados, normalizados respecto al número células al inicio del cultivo. Las barras representan la media ± SEM del análisis de al menos 3 lóbulos de cada grupo. Se muestra la significación estadística (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

### 1.3.2. Implicación de *Sfrp1* en la generación de linfocitos T en la vida postnatal.

Tras analizar el papel de *Sfrp1* durante la diferenciación T en estadios embrionarios, quisimos estudiar el efecto de *Sfrp1* en el desarrollo de los linfocitos T de ratón durante la vida postnatal, cuando ya ha tenido lugar el proceso de selección positiva y negativa de los timocitos con receptores TCR $\alpha\beta$  y se han generado las poblaciones maduras CD4SP y CD8SP. Para ello, analizamos el timo de ratones neonatos, tanto wt como *Sfrp1*<sup>-/-</sup>, observando una disminución significativa (3x) de timocitos totales en los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> con respecto a los wt, similar a la observada en los embriones de E16,5 (**Figura 19A**).

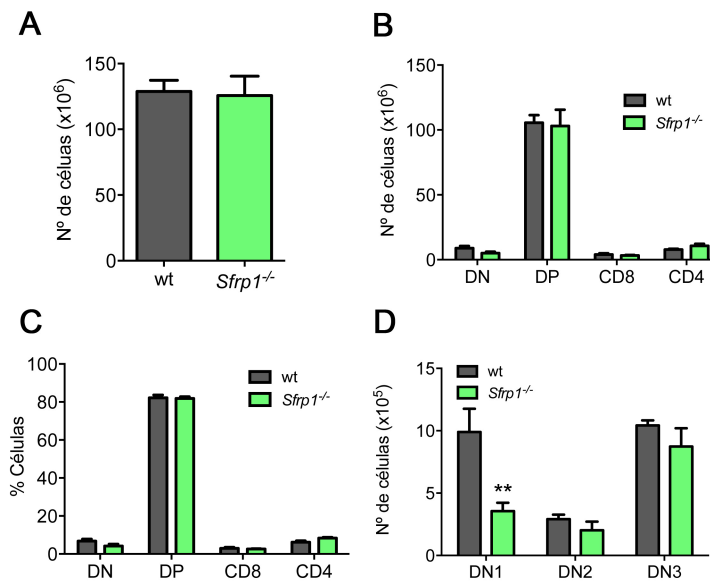


**Figura 19. La deficiencia de *Sfrp1* afecta la generación de células DP en ratones neonatos.** (A) Número de células totales presentes en el timo neonatal de ratones wt o *Sfrp1*<sup>-/-</sup>. (B) Análisis por citometría de flujo, (C) proporción y (D) número de células de las poblaciones DN, DP y SP definidas por los marcadores CD4 y CD8, presentes en el timo de los ratones en (A). (E) Porcentaje y (F) número absoluto de células en las distintas poblaciones DN, definidas por los marcadores CD44 y CD25, presentes en el timo de ratones neonatos. Las barras representan la media  $\pm$  SEM del análisis de 3 ratones de cada grupo. Se muestra la significación estadística (\*p<0,05).

Esta disminución afectaba en términos absolutos a todas las poblaciones intratímicas, aunque sólo las células DP mostraron una disminución significativa (4x), en comparación con la población DP control (**Figura 19B, C y D**), lo que correlacionaba con un incremento relativo de timocitos CD4SP y CD8SP (**Figura 19C**). Dentro de la población DN, observamos un descenso significativo en los números de progenitores

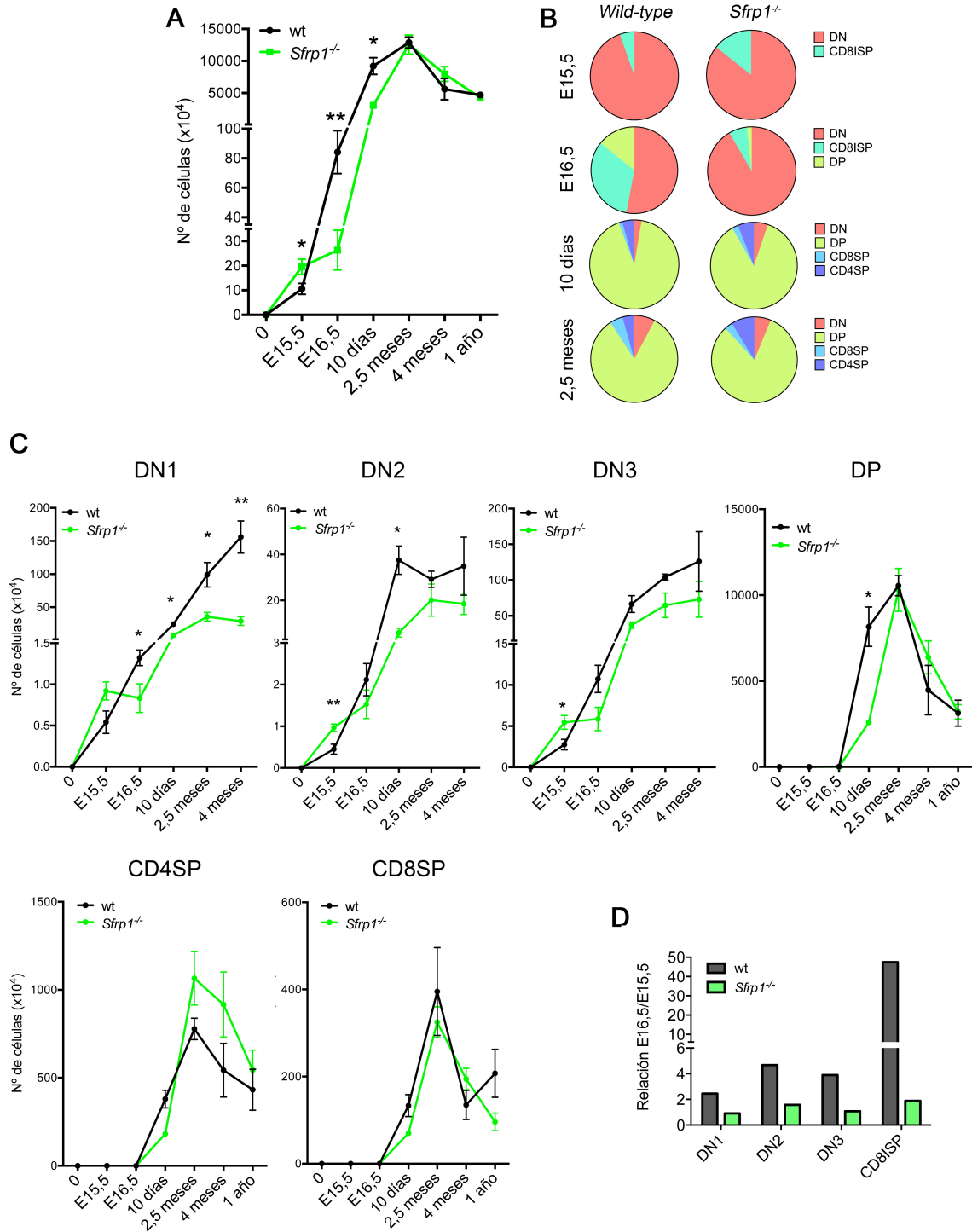
DN1 y DN2, tanto en términos absolutos como relativos, que es compatible con una pérdida selectiva de los mismos (**Figura 19E y F**). Por tanto, la ausencia de *Sfrp1* induce la pérdida de progenitores DN1 y DN2 con la edad. Además, al igual que en los embriones de E16,5, el número de células post-selección- $\beta$  DP se encuentra disminuido en los ratones neonatos deficientes para *Sfrp1*, y esta disminución también se observa en las poblaciones SP posteriores. Estos datos indican que la deficiencia en el proceso de selección- $\beta$  que se observa en los embriones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> se mantiene en el momento del nacimiento.

Finalmente, analizamos los timos procedentes de ratones wt o *Sfrp1*<sup>-/-</sup> adultos (2,5 meses), edad a la que se ha alcanzado la máxima expansión celular intratímica. No observamos diferencias significativas ni en el número de células totales (**Figura 20A**), ni en ninguna de las poblaciones mayoritarias DP, CD4SP y CD8SP entre ambos grupos de ratones (**Figura 20B**). Sin embargo, observamos una disminución significativa tanto en números relativos como absolutos de la población DN1 en los timos *Sfrp1*<sup>-/-</sup> (**Figura 20C y D**), lo que sugiere un agotamiento selectivo de los precursores más inmaduros DN1 en los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> adultos.



**Figura 20. La deficiencia de *Sfrp1* no afecta a la generación de timocitos maduros en ratones adultos.** Número de timocitos totales (A) o de las distintas poblaciones (B), definidas por los marcadores CD4 y CD8, presentes en el timo de ratones wt o *Sfrp1*<sup>-/-</sup> de 2,5 meses de edad. Porcentaje (C) y número absolutos (D) de las distintas poblaciones de DN1 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), definidas por los marcadores CD44 y CD25, presentes en el timo de ratones indicados. Las barras representan la media  $\pm$  SEM del análisis de al menos 4 ratones de cada grupo, se muestra la significación estadística (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

En resumen, nuestros resultados indican que la pérdida de la expresión de *Sfrp1* previa al estadio embrionario E15,5 genera un aumento en los números de progenitores DN (**Figura 21A y B**), asociado a una diferenciación acelerada de los mismos durante la ontogenia y al incremento en la expresión del IL-7R. Sin embargo, esta sobre-expresión también se asocia a un incremento en la apoptosis de las poblaciones DN, que se traduce en una pérdida de progenitores a lo largo del desarrollo ontogénico (**Figura 21C**). Además, el efecto sobre la apoptosis y la pérdida celular es mucho más acusado en aquellos timocitos que alcanzan el estadio DN3 y se someten al proceso de selección- $\beta$ , lo que da lugar a una dramática reducción de los números de células CD8ISP y DP (50x) y, por consiguiente, un bloqueo en la transición DN-DP en el estadio ontogénico E16,5, coincidiendo con la edad gestacional en la que se induce la expansión de las poblaciones que han superado el proceso de selección- $\beta$  (**Figura 21D**). Este bloqueo se compensa en ratones adultos deficientes en *Sfrp1* por la expansión y/o acumulación progresiva de las células post-selección- $\beta$  que sobreviven, tanto CD8ISP, como DP y SP, pero se acompaña de una pérdida selectiva de los progenitores intratímicos más tempranos DN1, seguramente debido a su diferenciación incrementada (**Figura 21C**). Se observa también un ligero incremento en proporciones y número de timocitos SP CD4<sup>+</sup>, que podría sugerir un control de *Sfrp1* sobre el proceso de selección positiva. Por lo tanto, *Sfrp1* parece ser fundamental en el control de la homeostasis de los progenitores de los linfocitos T durante su desarrollo, regulando su supervivencia y su dinámica de diferenciación antes y, especialmente, durante el proceso de selección- $\beta$ .



**Figura 21. Regulación diferencial en función de la edad de la distribución y de la generación de las poblaciones presentes en el timo en ausencia de *Sfrp1*.** (A) Números de timocitos totales presentes en los ratones wt o *Sfrp1*<sup>-/-</sup> en distintas edades embrionarias y postnatales. (B) Gráfico circular de los porcentajes de las distintas poblaciones DN, DP y SP (CD4, CD8), definidas por los marcadores CD4 y CD8, presentes en los ratones en (A). (C) Cinéticas de generación de las distintas subpoblaciones DN (DN1-DN4), DP y SP (CD4, CD8), en números absolutos. (D) Relación entre las poblaciones DN y CD8ISP a E15,5 y E16,5 presentes en el timo de los ratones indicados. Las barras representan la media  $\pm$  SEM del análisis de al menos 3 ratones de cada grupo. Se muestra la significación estadística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

## 2. Relevancia funcional de SFRP1 en la fisiopatología de la leucemia T linfoblástica aguda.

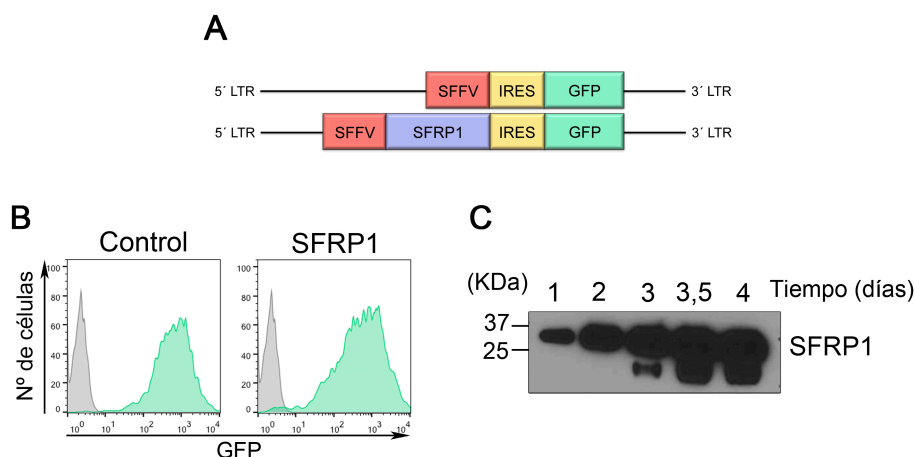
El estudio de la expresión y función de Sfrp1 durante el desarrollo ontogénico de los linfocitos T de ratón sugiere un papel regulador de la activación de Notch1 en dos momentos críticos del desarrollo en los que los precursores intratímicos se expanden en respuesta a los receptores de membrana IL-7R o preTCR, cuya expresión está regulada transcripcionalmente por Notch1. Es sabido que la desregulación de la activación de Notch1 durante este proceso tiene consecuencias fatales, dando lugar a la generación de más del 60% de las leucemias T-ALL, lo que sugiere que Sfrp1 pueda regular indirectamente el proceso leucemogénico mediante la regulación de Notch1. Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue determinar el efecto de Sfrp1 sobre la activación de la vía de Notch1 en leucemias T-ALL.

### 2.1. SFRP1 regula la activación de NOTCH1 en T-ALL.

#### 2.1.1. Efecto de SFRP1 sobre la activación de NOTCH1 en líneas celulares T-ALL.

Para establecer la función de SFRP1 sobre la activación de la vía de NOTCH1, utilizamos líneas celulares T-ALL humanas portadoras de mutaciones activadoras de *NOTCH1*, que se cultivaron en presencia de sobrenadantes condicionados enriquecidos en la proteína SFRP1. Los sobrenadantes procedían del cultivo de células JURKAT infectadas con un vector lentiviral bicistrónico que codifica para SFRP1 y GFP (SFRP1-IRES-GFP) (**Figura 22A**). La eficiencia de la infección de las células JURKAT se determinó mediante citometría de flujo (**Figura 22B**), comprobando que todas las células expresaban GFP y, por tanto, SFRP1. Como control, las células JURKAT se infectaron con el mismo vector portador únicamente de GFP (IRES-GFP) (**Figura 22A**). Para generar los sobrenadantes condicionados, las células transducidas se cultivaron a una concentración elevada ( $10^6$  células/ml) durante distintos días de cultivo. Los sobrenadantes de los cultivos de células JURKAT control o SFRP1<sup>+</sup> se analizaron confirmando la presencia de SFRP1 mediante *Western Blot* a los distintos días de cultivo analizados (1 – 4), para lo que se utilizó un anticuerpo específico frente al dominio CRD de la proteína. Observamos la producción de SFRP1 desde las 24h de cultivo, a los diferentes días analizados, detectándose además la aparición de formas

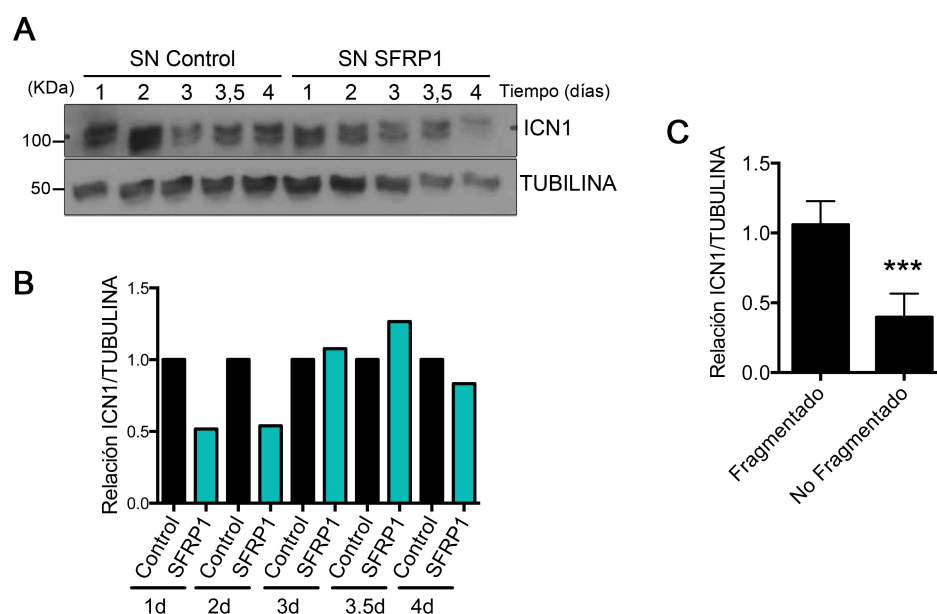
fragmentadas correspondientes al dominio CRD de la proteína (Bhat *et al.*, 2007) a partir de día 3 de cultivo (**Figura 22C**).



**Figura 22. Generación de sobrenadantes condicionados enriquecidos en SFRP1.** (A) Representación esquemática de los vectores lentivirales bicistronicos generados para sobreexpresar SFRP1 en células JURKAT, (B) Análisis por citometría de flujo de la expresión de GFP en las células JURKAT transducidas con los vectores mostrados en (A). El histograma sombreado en color gris representa la fluorescencia basal de células control que no han sido transducidas. (C) Análisis mediante *Western Blot* de los sobrenadantes generados durante distintos días tras cultivar las células JURKAT transducidas como en B. Se indica el peso molecular en Kilodaltons (KDa).

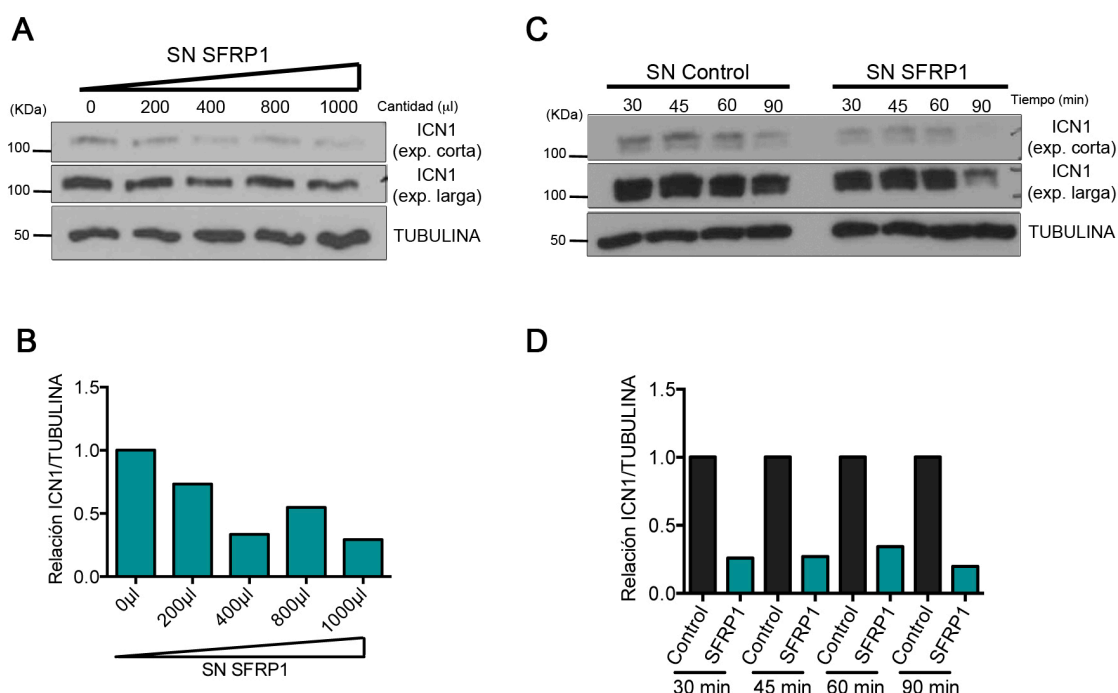
Para determinar la posible función de SFRP1 como inhibidor de la activación de NOTCH1, utilizamos la línea celular HPB-ALL, portadora de mutaciones activadoras en los dominios HD y PEST de *NOTCH1*, en la que la activación de NOTCH1, y la consiguiente liberación de su dominio intracelular (ICN1), es dependiente de la acción de las metaloproteasas ADAM (**Tabla 6**). Analizamos por Western Blot los niveles de expresión de ICN1 en las células HPB-ALL cultivadas con sobrenadantes procedentes del cultivo de uno o dos días de las células JURKAT transducidas con *SFRP1*, y observamos una bajada significativa en los niveles de expresión de ICN1, respecto a las células cultivadas en presencia de sobrenadantes control (**Figura 23A y B**). Sin embargo, los sobrenadantes de días posteriores, en los que detectamos proteína SFRP1 parcialmente fragmentada (**Figura 22C**), no inhibieron la activación de NOTCH1 (**Figura 23C**), lo que sugiere que la función inhibitoria de SFRP1 sobre la vía de NOTCH1 es impedida en presencia de fragmentos de SFRP1 (entre los que se encuentra el dominio CRD), que parecen competir con la función de la molécula intacta.





**Figura 23. La presencia de fragmentos portadores del dominio CRD de la proteína SFRP1 impide su función inhibitoria sobre la activación de NOTCH1.** (A) Análisis mediante *Western Blot* de la forma activa de NOTCH1 (ICN1) en células HPB-ALL tratadas con sobrenadantes condicionados control o SFRP1 obtenidos durante distintos días de cultivo. (B) Cuantificación de los niveles de ICN1 con respecto a TUBULINA mostrados en A. (C) Cuantificación de los niveles de ICN1 con respecto a TUBULINA expresados por células HPB-ALL incubadas con sobrenadantes condicionados que contienen o no SFRP1 fragmentado. Se indica el peso molecular en Kilodaltons (KDa). Las barras representan la media  $\pm$  SEM. Se muestra la significación estadística (\*\* $p < 0,001$ ).

La especificidad de la función inhibitoria de SFRP1 sobre la activación de NOTCH1 se demostró en experimentos de dosis-respuesta en células HPB-ALL, utilizando concentraciones crecientes de sobrenadantes control o SFRP1. Tras una hora de incubación, observamos una bajada gradual en los niveles de ICN1, que correlacionaba con el aumento de la concentración de SFRP1 en los cultivos (**Figura 24A y B**). Sin embargo, en ninguno de los experimentos observamos una inhibición total de la activación de NOTCH1. Para analizar si esta activación basal era dependiente del tiempo de cultivo, realizamos un experimento similar en el que las células HPB-ALL se cultivaron con sobrenadantes SFRP1 durante distintos tiempos, sin observar cambios significativos dependientes del tiempo en un intervalo de 30 a 90 minutos (**Figura 24C y D**). Por tanto, SFRP1 bloquea, al menos parcialmente, la activación de NOTCH1 analizada por la disminución de su forma activa, ICN1.



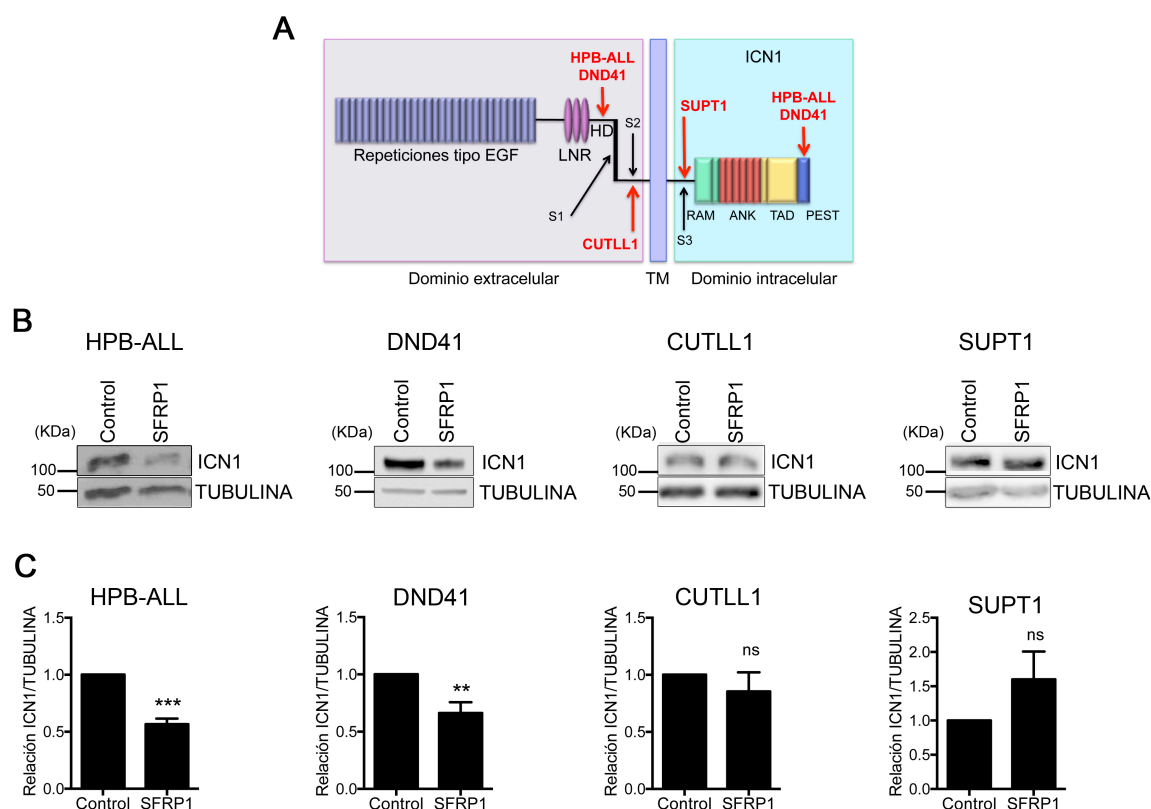
**Figura 24. La inhibición de NOTCH1 es dependiente de la concentración de SFRP1.** Análisis mediante *Western Blot* de la forma activa de NOTCH1 (ICN1) en células HPB-ALL tratadas con sobrenadantes condicionados con distintas concentraciones de SFRP1 (A) o incubadas durante distintos tiempos (C). (B, D) Cuantificación de los niveles de ICN1 respecto a TUBULINA mostrados en A y C, respectivamente. Se indica el peso molecular en Kilodaltons (KDa).

Estos datos sugieren que la base molecular de la función inhibitoria de SFRP1 en células T-ALL debe estar relacionada con la regulación de la actividad ADAM, implicada en el corte proteolítico del receptor NOTCH1, como describió previamente el grupo de la Dra. Bovolenta en la neurogénesis de retina de ratón (Esteve et al., 2011). Para comprobar esta posibilidad, utilizamos los sobrenadantes de células JURKAT de dos días de cultivo y analizamos el impacto de SFRP1 sobre la activación de NOTCH1 en distintas líneas celulares T-ALL. Utilizamos cuatro líneas celulares portadoras de diferentes mutaciones en *NOTCH1* (Tabla 6): HPB-ALL y DND41, con mutaciones en el dominio HD y en el dominio PEST, en las que la activación de NOTCH1 es dependiente del corte por proteínas ADAM; y CUTLL1 y SUPT1, con translocaciones cromosómicas que generan una forma truncada del receptor NOTCH1, que induce la activación de la vía independiente de la función metaloproteasa de ADAM (Figura 25A).

Línea celular	Mutación NOTCH1	Proteína NOTCH1	Tipo de mutación
JURKAT	-	WT	-
HPB-ALL	Exón 26: 4724 T/C Exón 34: 7329 del C, ins GGGCCGTGGACG	HD: 1585 L/P PEST: 2443 EGRGRCSHWAPAAWRCTLCPRR APPCPRRCHPRWSHP*STOP	Dominio HD Dominio PEST
DND41	Exón 26: 4781 T/C, 4829 A/T Exón 34: 7330 del C, ins TGT	HD: 1594 L/P, 1610 D/W PEST: 2444 CCSHWAPAAWRCTLCPRRAPPC PRRCHPRWSHP*STOP	Dominio HD Dominio PEST
CUTLL1	Translocación t(7;9): <i>TCRB-J2S4-NOTCH1</i> (exones 28-34)	Receptor NOTCH1 truncado en el extremo amino terminal, formado por los dominios transmembrana e intracelular	Translocación
SUPT1	Translocación: t(7;9)(q34;q34.3)	Receptor NOTCH1 truncado en el extremo amino terminal, formado el dominio intracelular	Translocación

**Tabla 6. Estado mutacional de *NOTCH1* en las líneas celulares utilizadas en este estudio.**

Cuando cultivamos estas líneas celulares en presencia de SFRP1, observamos una bajada significativa de los niveles de la forma procesada ICN1 únicamente en las células HPB-ALL y DND41, comparadas con las mismas células cultivadas con los sobrenadantes control. **(Figura 25B y D)**. Por el contrario, en las líneas celulares CUTLL1 y SUPT1 no observamos ninguna variación en los niveles de expresión de ICN1 en presencia de SFRP1 **(Figura 25B y D)**. Por lo tanto, estos datos confirman que SFRP1 reduce los niveles de activación de NOTCH1 exclusivamente en las líneas celulares T-ALL en las que la activación constitutiva de NOTCH1 es dependiente del procesamiento por ADAM.

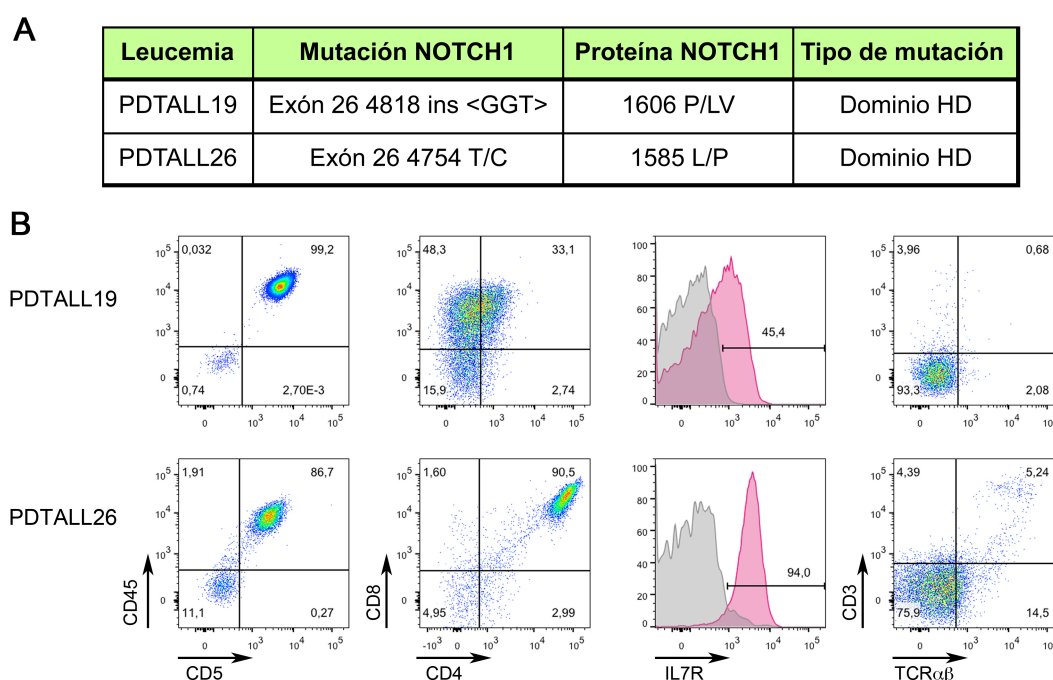


**Figura 25. SFRP1 reduce los niveles de activación de NOTCH1 en líneas T-ALL con mutaciones en el dominio HD.** (A) Representación esquemática de la localización de las mutaciones en NOTCH1 en las líneas celulares utilizadas. (B) Análisis mediante *Western Blot* de la expresión de la forma intracelular activa de NOTCH1 (ICN1) en las líneas celulares representadas en A, incubadas durante 1h con sobrenadantes condicionados control o SFRP1. (C) Cuantificación de los niveles de ICN1 en las líneas cultivadas como se muestra en (B). Los datos corresponden a tres experimentos independientes analizados respecto a la expresión de TUBULINA. Se indica el peso molecular en Kilodaltons (KDa). Las barras representan la media  $\pm$  SEM. Se muestra la significación estadística (ns: no significativo; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

### 2.1.2. Efecto de SFRP1 sobre la activación de NOTCH1 en leucemias humanas T-ALL primarias.

La modulación negativa de la activación de NOTCH1 por SFRP1 en líneas leucémicas portadoras de mutaciones activadoras de NOTCH1 es especialmente relevante considerando que más del 60% de las T-ALL primarias humanas portan este tipo de mutaciones (Weng *et al.*, 2004). Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue determinar el efecto de SFRP1 sobre la activación de NOTCH1 en leucemias humanas primarias. Con este fin, establecimos una colaboración con el Dr. Adolfo Ferrando (Columbia University, NY), que nos permitió seleccionar leucemias T-ALL portadoras de mutaciones activadoras de la vía de NOTCH1 dependientes del procesamiento por

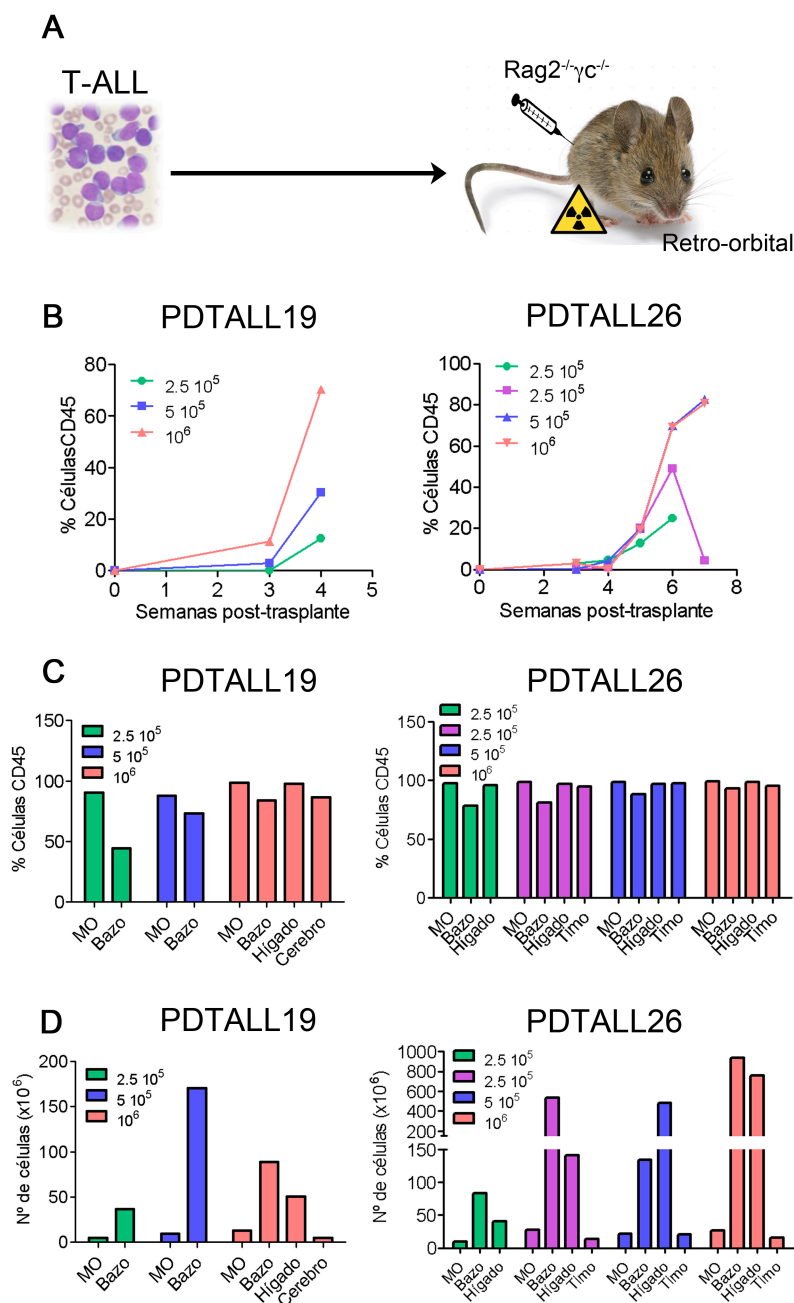
ADAM, y que, por tanto, pudieran ser susceptibles de la inhibición por SFRP1. Realizamos ensayos de secuenciación de *Sanger* en una cohorte de leucemias primarias de pacientes diagnosticados de T-ALL, de las que se seleccionaron dos leucemias primarias con dichas características, PDTALL19 y PDTALL26 (**Figura 25A**). Ambas leucemias expresaban los marcadores CD4 y CD8, y carecían de CD3 y TCR $\alpha\beta$ , así como de TCR $\gamma\delta$ ; y ambas eran positivas para la expresión del IL-7R (**Figura 25B** y datos no mostrados), por lo que se clasificaron como leucemias del grupo T-II (inmaduras) (Bene *et al.*, 1995).



**Figura 26. Características genéticas y fenotípicas de las leucemias T-ALL primarias seleccionadas.** (A) Análisis mutacional de *NOTCH1* en las leucemias primarias PDTALL19 y PDTALL26, realizado mediante secuenciación de *Sanger*. (B) Caracterización fenotípica por citometría de flujo de las leucemias analizadas en A. Las células primarias se expandieron por xenotrasplante en ratones inmunodeficientes previamente a su análisis.

Las leucemias T-ALL seleccionadas se expandieron en xenotrasplantes seriados en ratones inmunodeficientes Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> previamente irradiados, utilizando células leucémicas aisladas del bazo de receptores primarios (**Figura 27A**). El análisis de la sangre periférica de los ratones trasplantados (**Figura 27B**), reveló que a las 3-4 semanas post-trasplante se podían detectar células leucémicas en circulación. Todos los ratones trasplantados, independientemente del número de células inoculadas ( $5 \times 10^5$  –  $1 \times 10^6$ ), desarrollaron de manera eficiente leucemia T-ALL y fueron sacrificados

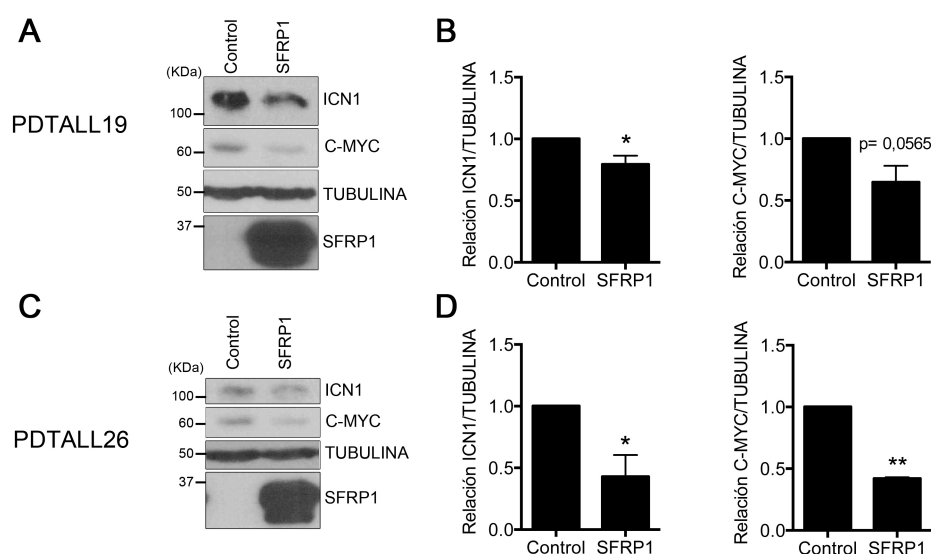
usando el criterio de punto final. El análisis de los distintos órganos de estos ratones indicó que las leucemias habían infiltrado órganos linfoides como el timo, la MO y el bazo; y órganos no linfoides, como el hígado y el cerebro (**Figura 27C y D**), lo que recapitula eficientemente la enfermedad en pacientes.



**Figura 27. Expansión *in vivo* de leucemias T-ALL en ratones inmunodeficientes.** (A) Esquema del modelo de xenotrasplante. Las células leucémicas fueron inyectadas de manera intravenosa en el seno retro-orbital de ratones inmunodeficientes previamente irradiados. (B) Porcentaje de células CD45+ en sangre periférica a distintas semanas post-trasplante. Porcentajes (C) y números totales (D) de células leucémicas CD45+, detectadas en la MO, bazo, hígado, cerebro y timo de los ratones trasplantados como en A a semana 4 (izquierda) y 6 post-trasplante (derecha).

Las células leucémicas procedentes del bazo y de la médula ósea de estos animales se cultivaron durante 4 horas con sobrenadantes condicionados enriquecidos en SFRP1 o sobrenadantes control procedentes de las células JURKAT. Analizamos mediante *Western Blot* la activación de la vía de Notch1 en las células T-ALL primarias,

observando que SFRP1 inducía una bajada significativa en la expresión de NOTCH1 activo (ICN1) así como de su diana C-MYC, en ambas leucemias (**Figura 28**). Estos datos indican que SFRP1 inhibe la activación de NOTCH1 en leucemias primarias de pacientes diagnosticados de T-ALL con mutaciones activadoras de NOTCH1 dependientes de las ADAM, lo que sugiere que el tratamiento con SFRP1 puede ser una eficiente estrategia para el tratamiento de este tipo de leucemias.



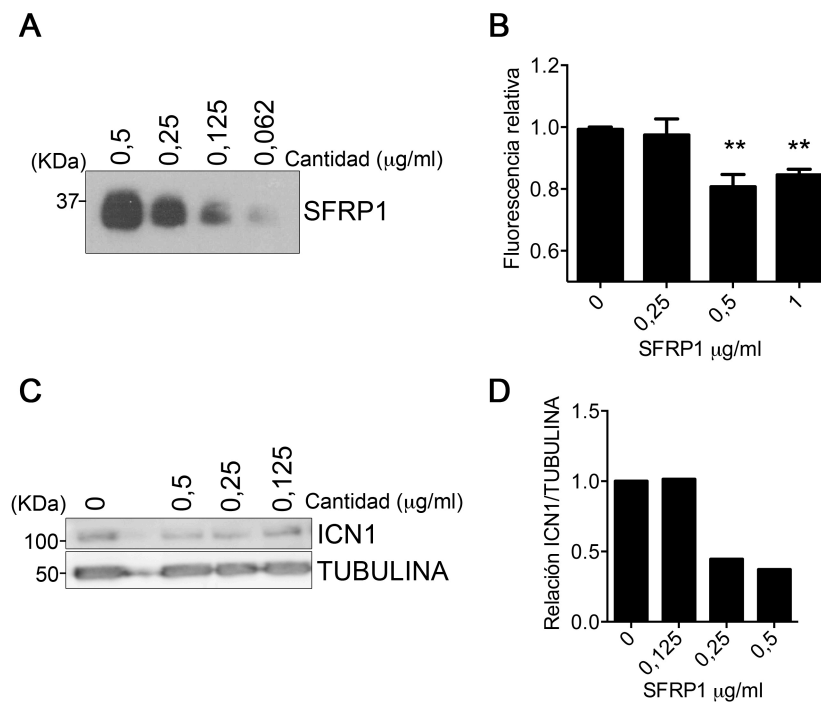
**Figura 28. SFRP1 disminuye la activación de NOTCH1 en leucemias primarias T-ALL con mutaciones activadoras de NOTCH1 en el dominio HD dependientes del procesamiento por ADAMs.** (A, C) Análisis mediante *Western Blot* de la expresión de la forma activa de NOTCH1 (ICN1) y C-MYC en las leucemias primarias PTDALL19 y PTDALL26 tras la incubación durante 4 horas con sobrenadantes enriquecidos en SFRP1 o sobrenadantes control. (B, D) Cuantificación de los niveles de ICN1 y C-MYC con respecto a TUBULINA de tres experimentos independientes realizados como en A y C. Se indica el peso molecular en Kilodaltons (KDa). Las barras representan la media  $\pm$  SEM, se muestra la significación estadística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

## 2.2. SFRP1 inhibe la activación de NOTCH1 mediante la regulación de la actividad de las metaloproteasas ADAM.

Los datos presentados sugieren que SFRP1 inhibe la activación de NOTCH1 en líneas celulares y leucemias primarias T-ALL mediante la inhibición directa de la función enzimática de las ADAM, implicadas en el procesamiento de ICN1. Aunque tanto ADAM10 como ADAM17 son capaces de activar la vía de NOTCH1, se ha propuesto que, en condiciones fisiológicas, la activación de NOTCH1 se induciría



preferencialmente a través de ADAM10 (Tian *et al.*, 2008). Sin embargo, el grupo del Dr. Adolfo Ferrando (Columbia University, NY), entre otros, describió que en condiciones patológicas, como pueden ser las T-ALLs con mutaciones en *NOTCH1*, ambas metaloproteasas contribuyen a la activación oncogénica de NOTCH1 (Bozkulak y Weinmaster, 2009; Sulis *et al.*, 2011). Considerando, además, que se ha descrito que Sfrp1 y Sfrp3 son capaces de inhibir la actividad de ADAM10 y ADAM17, en otros sistemas (Esteve *et al.*, 2011a; Oldefest *et al.*, 2015), nuestro siguiente objetivo fue comprobar de forma directa el efecto inhibitor de SFRP1 sobre la actividad de las metaloproteasas ADAM. Para ello, utilizamos un ensayo enzimático de la actividad ADAM medido por emisión de fluorescencia en células HPB-ALL que expresan al menos ADAM10 y ADAM17 (Sulis *et al.*, 2011), tras su incubación durante 45 minutos con concentraciones crecientes de proteína recombinante humana SFRP1 (**Figura 29A**).

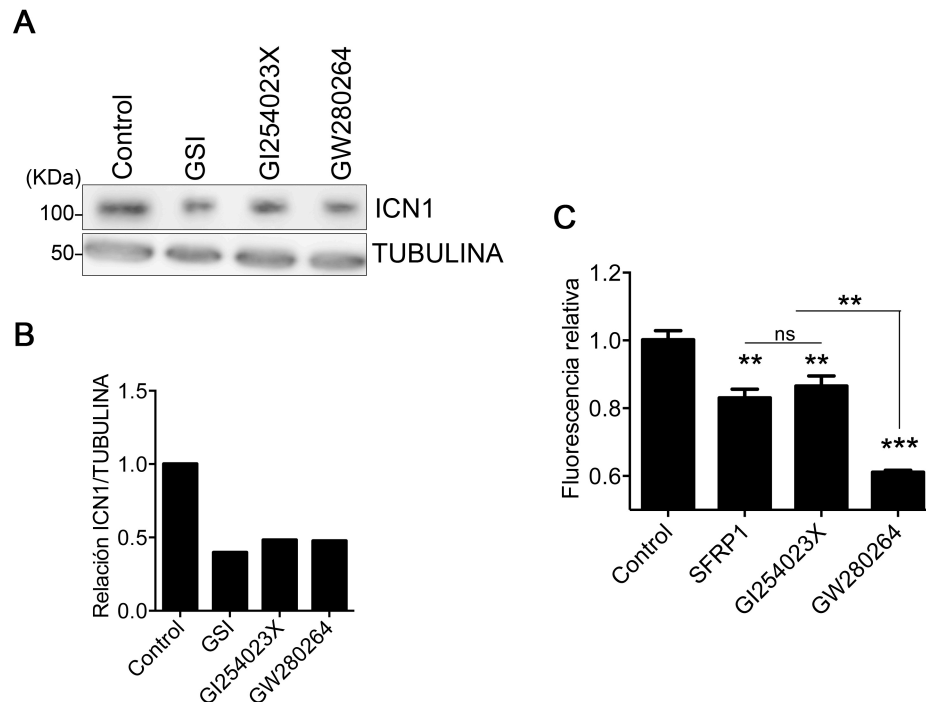


**Figura 29. SFRP1 disminuye la actividad de las metaloproteasas de la familia ADAM.** (A) Análisis mediante *Western Blot* de la proteína SFRP1 utilizada en B, C y D. (B) Representación en fluorescencia relativa de la actividad de las metaloproteasas de la familia ADAM tras incubación 45 minutos la línea celular HPB-ALL en presencia de distintas cantidades de SFRP1. (C) Análisis mediante *Western Blot* de la forma activa de NOTCH1 (ICN1) de células HPB-ALL tratadas con distintas cantidades de SFRP1. (D) Cuantificación de los niveles de ICN1 con respecto a TUBULINA mostrados en C. Se indica el peso molecular en Kilodaltons (KDa). Las barras representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Se muestra la significación estadística (\*\* $p < 0,01$ ).



Como se muestra en la **Figura 29B**, observamos una disminución significativa de la actividad ADAM dependiente de la concentración de SFRP1. Esta disminución se correlacionaba con una bajada de los niveles de activación de NOTCH1 (ICN1), sin encontrar ninguna diferencia en los niveles de ICN1 a concentraciones de SFRP1 menores de 0,25 µg/ml (**Figura 29C y D**). Por tanto, nuestros resultados confirman que la inhibición de la activación de NOTCH1 mediada por SFRP1 en leucemias T-ALL es debida a la inhibición de la actividad de ADAM10 y/o ADAM17.

Considerando que el ensayo de actividad enzimática utilizado permite detectar la actividad de varias ADAMs: ADAM9, ADAM10 y ADAM17, quisimos determinar cuál de ellas estaba siendo inhibida por SFRP1 en las células HPB-ALL. Para ello, utilizamos en el ensayo distintos inhibidores específicos: un inhibidor de ADAM10 (GI254023X) (5 µM), un inhibidor dual de ADAM10 y ADAM17 (GW280264) (10 µM), un inhibidor de la γ-secretasa (GSI) (compuesto E, 200 nM) como control positivo y DMSO como control negativo, y comprobamos si eran capaces de inhibir la activación de NOTCH1 en células HPB-ALL a tiempos cortos. Tras 45 minutos de incubación se analizaron los niveles de activación de NOTCH1 (ICN1) mediante *Western Blot*. De esta manera comprobamos que todos los inhibidores utilizados fueron capaces de disminuir la activación de NOTCH1 en las células HPB-ALL (**Figura 30A y B**). Seguidamente, realizamos el ensayo de fluorescencia para medir la actividad ADAM, incluyendo una condición en presencia de SFRP1 (0,5 µg/ml). Observamos que tanto SFRP1 como el inhibidor específico de ADAM10 disminuían significativamente la actividad ADAM, sin encontrar diferencias entre ambos compuestos (**Figura 29C**). Sin embargo, en presencia del inhibidor dual de ADAM10 y ADAM17 se incrementaba de manera significativa la inhibición de la actividad ADAM hasta un 20% más, comparado con la inhibición mediada por SFRP1 y el inhibidor específico de ADAM10. Por tanto, estos datos sugieren que SFRP1 podría estar inhibiendo únicamente ADAM10 en T-ALLs, debido a que su efecto es similar al del inhibidor específico de ADAM10.



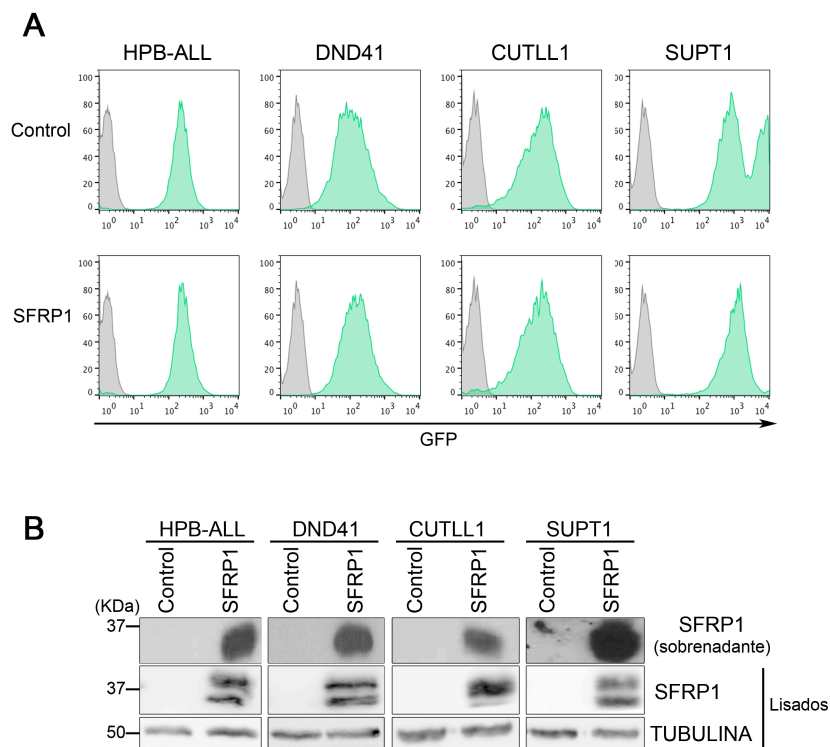
**Figura 30. SFRP1 disminuye la actividad de las metaloproteasas de la familia ADAM con la misma eficiencia que el inhibidor específico de ADAM10.** (A) *Western Blot* de la forma activa de NOTCH1 (ICN1) en células HPB-ALL tratadas durante 45 minutos con distintos inhibidores de la vía de NOTCH1: inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa (GSI) (200nM), inhibidor de ADAM10 (GI254023X) (5 $\mu$ M) e inhibidor dual de ADAM10 y ADAM17 (GW280264) (10 $\mu$ M). Se indica el peso molecular en Kilodaltons (KDa). (B) Cuantificación de los niveles de ICN1 con respecto a TUBULINA mostrados en A. (C) Representación en fluorescencia relativa de la actividad de las metaloproteasas ADAM en presencia de distintos inhibidores de su función proteolítica. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de tres replicados. Se muestra la significación estadística (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

### 2.3. Estudio de la función de SFRP1 en la progresión tumoral de las leucemias T-ALL dependientes de NOTCH1.

#### 2.3.1. SFRP1 inhibe la proliferación *in vitro* e *in vivo* de líneas celulares T-ALL.

Estudios pioneros realizados por el grupo del Dr. Adolfo Ferrando demostraron la dependencia de la activación de NOTCH1 en el mantenimiento de la viabilidad y la proliferación *in vitro* de líneas y leucemias primarias T-ALL portadoras de mutaciones activadoras de NOTCH1 (Palomero *et al.*, 2006b; Weng *et al.*, 2004). Para analizar si el efecto de SFRP1 sobre la inhibición de la activación de NOTCH1 se reflejaba en la proliferación leucémica, realizamos estudios de ganancia de función mediante la sobreexpresión de la proteína SFRP1 humana por transducción lentiviral con un vector

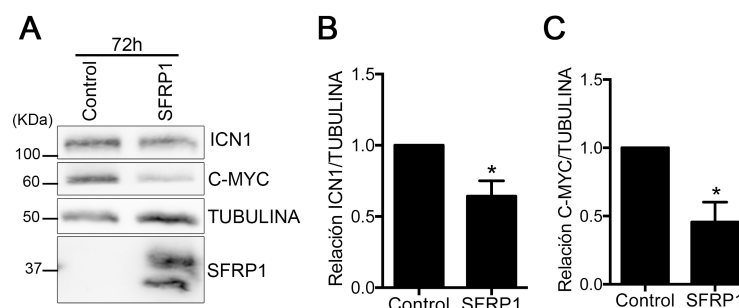
bicistrónico que expresa SFRP1 y GFP o sólo GFP como control, en líneas celulares T-ALL (**Figura 31A**). Estas líneas celulares presentan distintas formas de la molécula NOTCH1 (**Tabla 6**): las células JURKAT poseen el receptor wt, las células HPB-ALL y DND41 poseen mutaciones en el dominio HD y PEST, y las líneas celulares CUTLL1 y SUPT1 poseen translocaciones en *NOTCH1* (**Figura 23A**). El análisis por citometría de flujo de la expresión de GFP en las células transducidas, reveló que ambos vectores (GFP y SFRP1) mostraban eficiencias de transducción de casi el 100% en todas las líneas analizadas, excepto en la línea celular HPB-ALL, por lo que se realizó una separación celular mediante citometría de flujo para así obtener una población homogénea para la expresión de GFP (datos no mostrados). Tras la transducción, se comprobó mediante Western Blot que todas las líneas celulares expresaban SFRP1 en los lisados y que además eran capaces de secretar la proteína al medio extracelular (**Figura 31B**).



**Figura 31. La sobre-expresión de SFRP1 en líneas T-ALL produce la liberación de SFRP1 al medio extracelular.** (A) Análisis por citometría de flujo de la sobre-expresión de SFRP1 y GFP o sólo el control GFP en distintas líneas celulares T-ALL con mutaciones activadoras de la vía de NOTCH1. El histograma sombreado de color gris representa el control de células no transducidas. (B) *Western Blot* de los sobrenadantes y lisados generados a partir de las líneas celulares mostradas en A. Se indica el peso molecular en Kilodaltons (KDa)

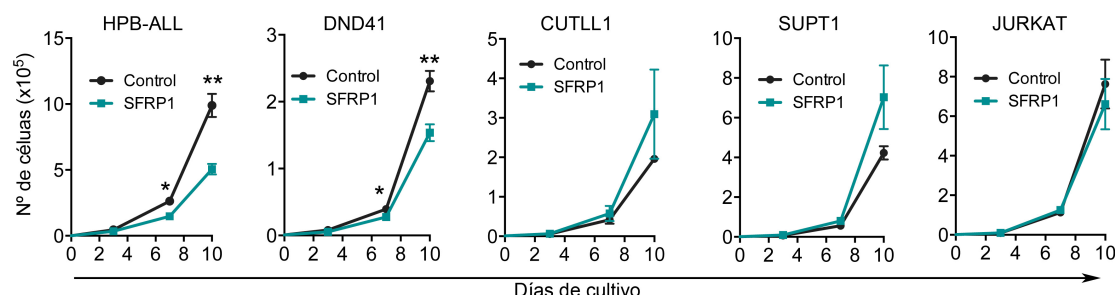
Con el objetivo de comprobar si SFRP1 era capaz de inhibir la activación de NOTCH1 de forma autocrina, se realizaron cultivos de la línea celular HPB-ALL transducida con el vector que codifica para SFRP1 o el vector control a concentraciones altas ( $10^6$  células/ml). Analizamos mediante *Western Blot* los niveles de activación de NOTCH1 (**Figura 32A y B**), observando una inhibición selectiva de ICN1 en las células

que expresaban SFRP1. Además, pudimos observar que los niveles de la proteína C-MYC en estas células también se veían afectados cuando se sobre-expresaba SFRP1 (**Figura 32A y C**).



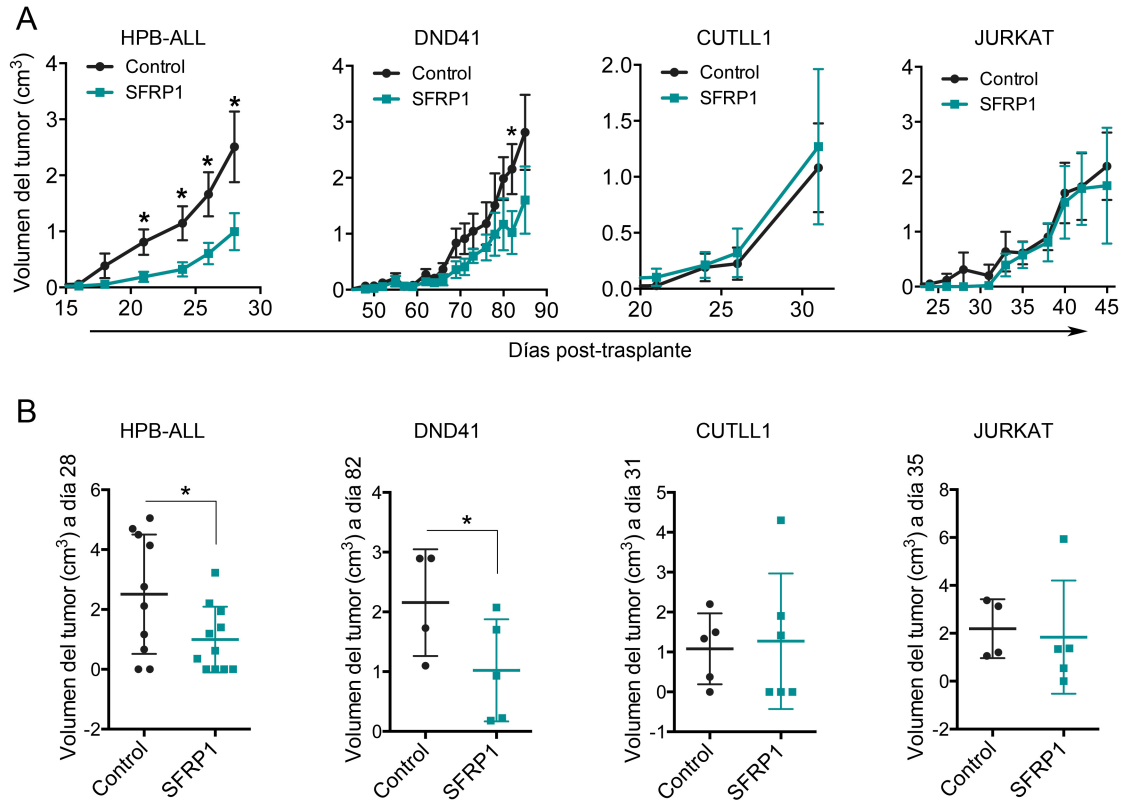
**Figura 32. La expresión ectópica de SFRP1 en líneas T-ALL regula de manera autocrina la activación de NOTCH1.** (A) Análisis mediante *Western Blot* de la forma activa de NOTCH1 y C-MYC en la línea celular HPB-ALL sobre-expresando SFRP1 o el control GFP tras 72h de cultivo. Se indica el peso molecular en Kilodaltons (KDa). Cuantificación de los niveles de ICN1 (B) y C-MYC (C) con respecto a TUBULINA de tres experimentos independientes realizados como en A. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. Se muestra la significación estadística (\* $p < 0,05$ ).

Por tanto, SFRP1 se secreta correctamente y es capaz de inhibir la vía de NOTCH1 de forma autocrina en líneas T-ALL. Para analizar si este efecto de SFRP1 tenía consecuencias en la proliferación de las líneas celulares T-ALL dependientes de NOTCH1, analizamos la expansión durante diez días de cultivo de las cuatro líneas T-ALL transducidas con SFRP1 (**Figura 31**) y de la línea JURKAT como control (**Figura 22**). Los datos obtenidos mostraron que la sobre-expresión de SFRP1 inhibía significativamente la proliferación de las líneas celulares que poseen mutaciones en el dominio HD de *NOTCH1* (HPB-ALL y DND41); sin embargo, la proliferación no se veía afectada en las líneas celulares con translocaciones en *NOTCH1* y son independientes de la activación mediada por las ADAM (CUTLL1 y SUPT1), ni en la línea celular que expresa el receptor wt (JURKAT) (**Figura 33**). Por tanto, SFRP1 es un regulador de la proliferación de líneas celulares T-ALL con mutaciones en el dominio HD de *NOTCH1*.



**Figura 33. La sobre-expresión de SFRP1 reduce la proliferación *in vitro* de las líneas celulares leucémicas dependientes de NOTCH1 con mutaciones en el dominio HD.** Proliferación de distintas líneas celulares T-ALLs con mutaciones en *NOTCH1* transducidas con SFRP1 y GFP, o sólo GFP, mantenidas en cultivo durante 10 días. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Se muestra la significación estadística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

Finalmente, quisimos analizar el posible potencial anti-oncogénico de SFRP1 *in vivo*, para lo que se realizaron trasplantes subcutáneos de las líneas celulares leucémicas con mutaciones en *NOTCH1* transducidas con el vector lentiviral portador de SFRP1 y GFP o un vector control GFP, en ratones inmunodeficientes NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG). Observamos un retraso significativo en el crecimiento de los tumores subcutáneos generados a partir de las células portadoras de SFRP1 en las líneas celulares con mutaciones en el dominio HD de *NOTCH1* (HPB-ALL y DND41), sin observar ningún efecto en las líneas celulares con translocación en *NOTCH1* (CUTLL1) o con el receptor wt (JURKAT) (**Figura 34**). En conclusión, nuestros datos indican que la sobre-expresión de SFRP1 reduce la proliferación *in vitro* y la progresión tumoral *in vivo*, selectivamente en líneas celulares T-ALL en las que la activación constitutiva de NOTCH1 es dependiente de la función de las metaloproteasas ADAM.

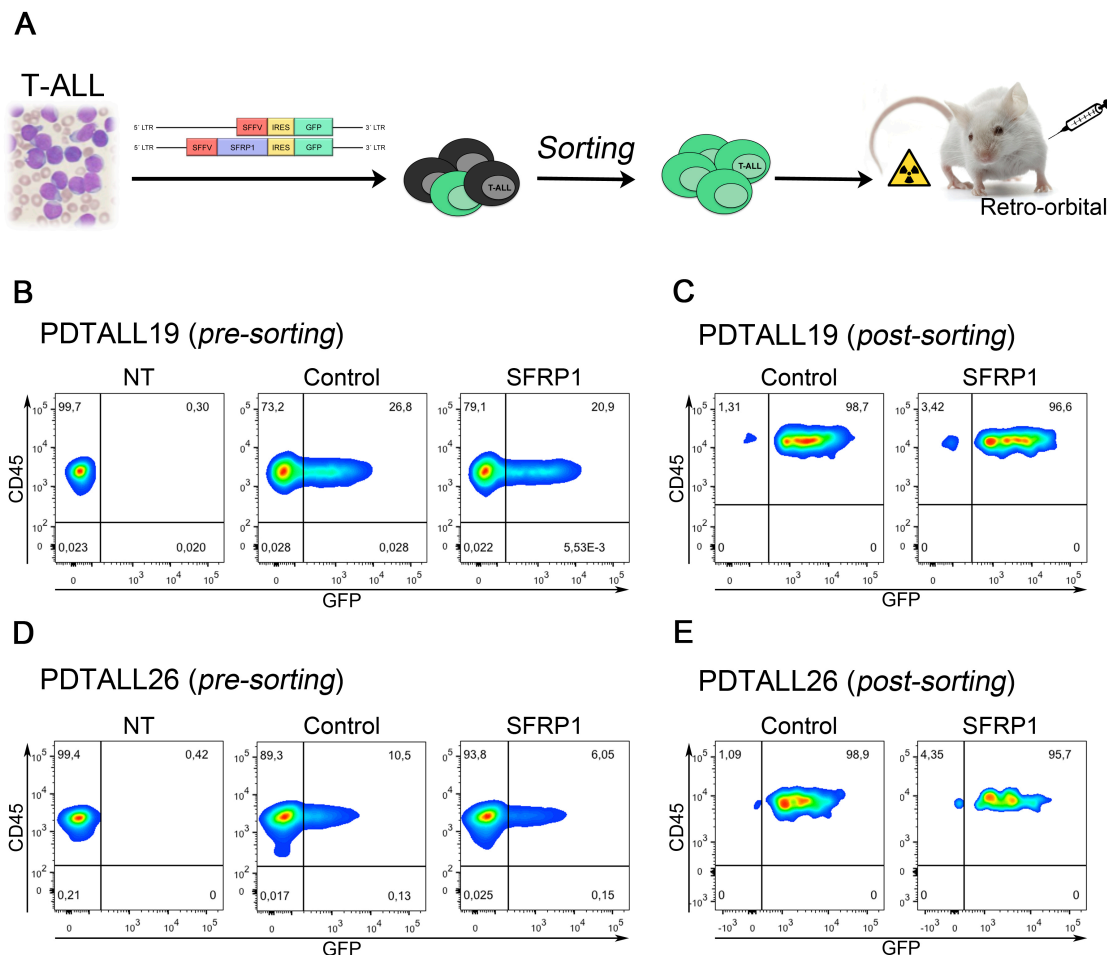


**Figura 34. La sobre-expresión de SFRP1 reduce la expansión tumoral *in vivo* de T-ALLs dependientes de NOTCH1 con mutaciones en el dominio HD.** (A) Progresión tumoral *in vivo* de implantes subcutáneos de líneas celulares T-ALL transducidas con SFRP1 o con el control GFP en ratones NSG. (B) Volumen del tumor en un día concreto de A. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de al menos tres ratones por grupo. Se muestra la significación estadística (\* $p < 0,05$ ).

### 2.3.2. Efecto de SFRP1 en la progresión de leucemias T-ALL primarias.

Nuestro siguiente objetivo fue determinar si SFRP1 podía regular la progresión y la expansión *in vivo* de leucemias primarias de pacientes diagnosticados de T-ALL. Con este fin utilizamos las leucemias PDTALL19 y PDTALL26 portadoras de mutaciones en el dominio HD (**Figura 26**) previamente expandidas en ratones inmunodeficientes (**Figura 27**). Estas células leucémicas fueron transducidas con el vector bicistónico lentiviral que codifica para SFRP1 y GFP o sólo GFP, como control negativo, y se mantuvieron en cocultivo sobre un estroma de células OP9 en presencia de IL-7 durante tres días. Transcurrido este tiempo, se analizó la eficiencia de las infecciones mediante citometría de flujo, observándose una eficiencia del 5-25% (**Figura 35B y D**), por lo que se realizó un aislamiento de las células transducidas mediante citometría de flujo, en base a la expresión de los marcadores CD45 y GFP, con el fin de que todas las células secretaran SFRP1 (**Figura 35C y E**). Posteriormente se inyectaron 50.000 células

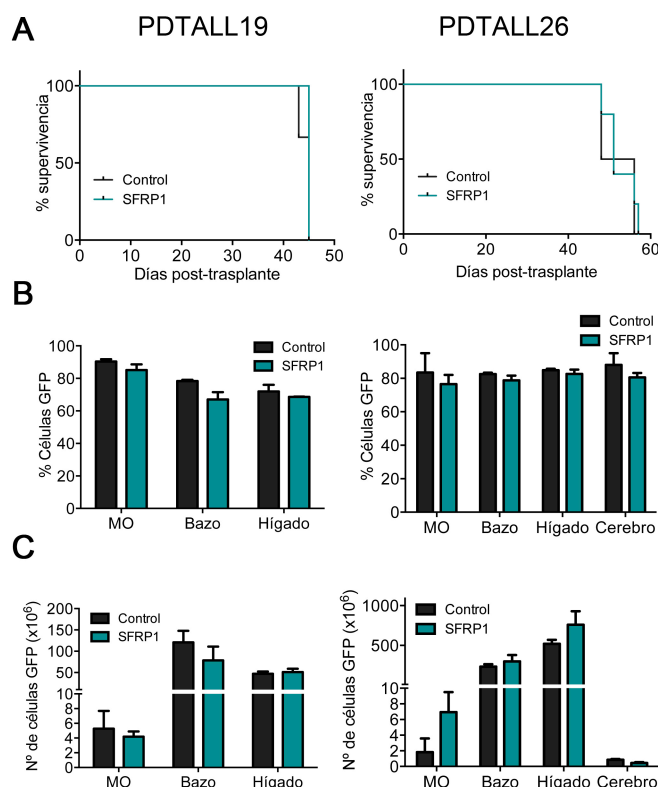
control o SFRP1<sup>+</sup> en el seno retro-orbital de ratones inmunodeficientes NSG previamente irradiados (**Figura 35A**), y analizamos la progresión tumoral a lo largo del tiempo en los ratones trasplantados.



**Figura 35. Xenotrasplante de leucemias primarias de pacientes de T-ALL transducidas con SFRP1.** (A) Representación esquemática del modelo de xenotrasplante. Las células leucémicas primarias fueron inyectadas en el seno retro-orbital de ratones inmunodeficientes previamente irradiados. Análisis por citometría de flujo de la eficiencia de transducción de las leucemias antes de la separación celular (B, D) y después de la separación celular (C, E) infectadas con el vector codificante para SFRP1 y GFP o el control sólo con GFP.

Todos los ratones trasplantados, tanto con células leucémicas control como SFRP1, desarrollaron la enfermedad y fueron sacrificados de acuerdo al criterio de punto final entre 45 y 60 días post-trasplante, lo que pone de manifiesto la agresividad de las leucemias analizadas. No se observaron diferencias significativas en cuanto a supervivencia entre ambas condiciones (control o SFRP1) en ninguna de las dos leucemias analizadas (**Figura 36A**). Además, en ambas condiciones las leucemias colonizaron eficientemente los órganos periféricos de los ratones trasplantados,

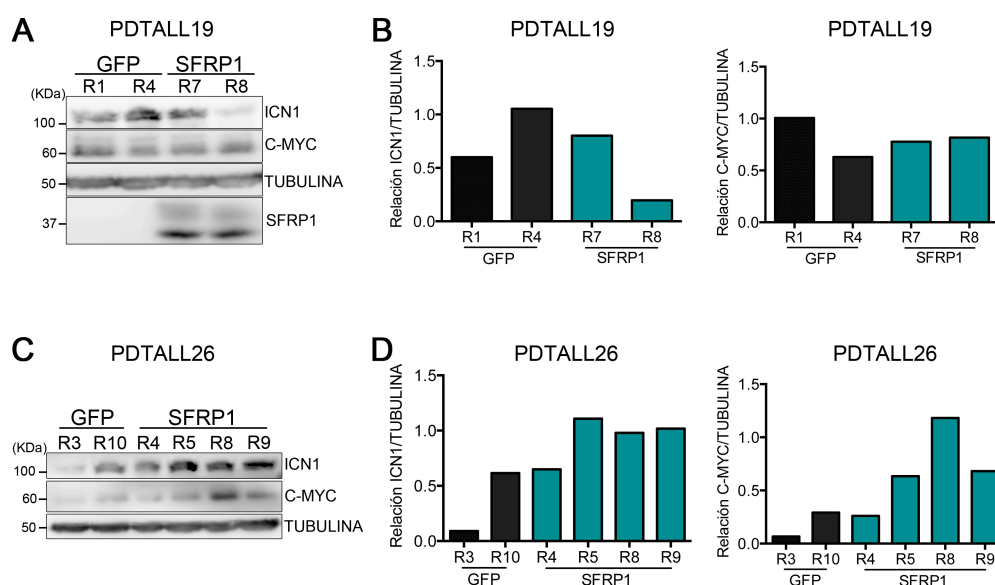
observándose una infiltración tumoral de las células leucémicas independiente de la expresión de SFRP1 (**Figura 36B y C**). Estos datos sugieren que las concentraciones de SFRP1 producidas a nivel sistémico en los animales trasplantados no son eficientes para inhibir la activación de NOTCH1 dependiente de las ADAM *in vivo*.



**Figura 36. La sobre-expresión de SFRP1 no impide la expansión *in vivo* de leucemias primarias T-ALL en ratones NSG.** (A) Curva de Kaplan-Meier que representa la supervivencia de los ratones trasplantados con células leucémicas transducidas con SFRP1 y GFP o sólo GFP. Porcentaje (B) y número absoluto (C) de células GFP<sup>+</sup> presentes en MO, bazo, hígado y cerebro de los ratones trasplantados en A, a 6 y 7 semanas post-trasplante. Los números representan el porcentaje referido al total de células en cada órgano. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de al menos dos ratones por grupo.

Para comprobar esta posibilidad, analizamos la activación de NOTCH1 en las células procedentes del bazo de los ratones trasplantados con las leucemias PDTALL19 y PDTALL26 SFRP1 y control mediante *Western Blot*, y confirmamos que ninguna de las dos leucemias transducidas con SFRP1 presentaba una inhibición en los niveles de activación de NOTCH1 (ICN1) ni de expresión de su diana C-MYC respecto a las leucemias control (**Figura 37**). Estos datos indican que la producción autocrina de SFRP1 en las leucemias primarias T-ALL analizadas no es suficiente para inhibir la activación de NOTCH1 *in vivo* ni para bloquear la expansión tumoral en el modelo de xenotrasplante utilizado.





**Figura 37. La producción autocrina de SFRP1 no es capaz de bloquear la activación de NOTCH1 en leucemias T-ALL *in vivo*.** (A, C) Análisis mediante *Western Blot* de la forma activa de NOTCH1 y de C-MYC en las leucemias primarias PDTALL19 y PDTALL26. Las células utilizadas provienen del bazo de ratones trasplantados con células que expresan SFRP1 y GFP o sólo GFP, obtenidas a 5 semanas post-trasplante. Se indica el peso molecular en Kilodaltons (KDa). (B, D) Cuantificación de la proteína de A y C con respecto a TUBULINA de las leucemias PDTALL19 y PDTALL26 respectivamente.

Aunque los resultados derivados de los estudios de xenotrasplante de T-ALL primarias sugieren un efecto terapéutico limitado de SFRP1, nuestros resultados *in vitro* indican que SFRP1 puede actuar como supresor tumoral, inhibiendo la vía de señalización de NOTCH1 así como la progresión tumoral *in vitro* e *in vivo* en líneas celulares T-ALL con mutaciones en el dominio HD de *NOTCH1*. Por tanto, nuestros estudios son compatibles con una posible función terapéutica de SFRP1 en el tratamiento de leucemias T-ALL dependientes de NOTCH1. La confirmación de esta posibilidad, requiere estudios adicionales más exhaustivos que permitan implementar estrategias eficientes para potenciar su función *in vivo*.

### 3. Caracterización de las mutaciones y de la regulación epigenética de *SFRP1* en la T-ALL.

La supresión o disminución de la expresión de *SFRP1* parece tener un papel fundamental en la generación de diversos tipos de tumores, como es el caso del cáncer de mama, gástrico y cervical. La pérdida de expresión de *SFRP1* puede deberse a la delección de la región cromosómica 8p12-p11.1, o a su silenciamiento epigenético, siendo este último el mecanismo más común en los cánceres hematológicos como el mieloma múltiple, la leucemia linfocítica crónica y la leucemia mieloide aguda (revisado en (Esteve y Bovolenta, 2010), sin haberse descrito esta asociación en T-ALL.

Nuestros datos sugieren que *SFRP1* puede ser un factor anti-oncogénico en T-ALL debido a su potencial para inhibir la vía de NOTCH1, tanto en líneas celulares como en leucemias primarias T-ALL, así como por su capacidad de impedir la progresión tumoral de líneas celulares T-ALL *in vivo*. Por tanto, es posible que *SFRP1* pueda estar también involucrado en la generación de este tipo de leucemias, sobre todo si consideramos que su ausencia durante el desarrollo temprano de los linfocitos T provoca una expansión selectiva de los progenitores intratímicos en momentos fundamentales de su desarrollo. Por tanto, el siguiente objetivo que nos planteamos fue estudiar si *SFRP1* podría tener un impacto en la patogénesis de la T-ALL y, en concreto, si podría estar desregulado en este tipo de leucemias. Para analizar esta posibilidad, se estableció una colaboración con el Dr. Adolfo Ferrando con el fin de investigar la posible presencia de mutaciones en *SFRP1* en una cohorte de leucemias primarias de pacientes diagnosticados de T-ALL.

#### 3.1. Identificación de mutaciones en el gen *SFRP1* en leucemias primarias de pacientes diagnosticados de T-ALL.

La incidencia de mutaciones en el gen *SFRP1* en T-ALL se analizó en una cohorte de 23 muestras primarias de pacientes diagnosticados de T-ALL mediante *Next generation sequencing* del ADN correspondiente a los exones codificantes del factor *SFRP1*. Este análisis permitió identificar una mutación en el gen *SFRP1* en un único paciente de T-ALL (**Tabla 7**), por lo que concluimos que la frecuencia de mutaciones genómicas en *SFRP1* en T-ALL es muy baja (4%).

Muestra	Paciente	Exón	Mutación
T-ALL	17	1	G16C

**Tabla 7. Mutaciones en el gen *SFRP1* en leucemias primarias de pacientes diagnosticados de T-ALL.** Mutación encontrada en un único paciente tras analizar mediante *Next generation sequencing* una cohorte de 23 leucemias primarias T-ALL.

### 3.2. Identificación de modificaciones epigenéticas en *SFRP1* en leucemias T-ALL primarias humanas.

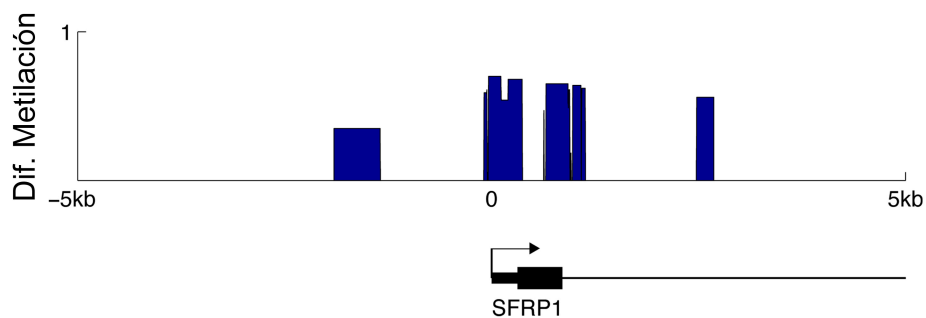
Considerando que el mecanismo más común de disminución de la expresión de *SFRP1* observada en los cánceres hematológicos es mediante su silenciamiento epigenético, realizamos un estudio de las modificaciones epigenéticas en el gen *SFRP1* en la misma cohorte de 23 muestras primarias de pacientes. Como control de metilación, estas leucemias se compararon con 10 muestras de células T normales. Los datos obtenidos, comparando ambos grupos de muestras, mostraron que existen quince regiones significativamente hipermetiladas en el gen *SFRP1* en las muestras primarias de leucemias T-ALL (**Figura 38**) que, por tanto, determinan el silenciamiento del gen *SFRP1*.

Como conclusión, nuestros datos indican que la pérdida de la expresión de *SFRP1* en momentos tempranos del desarrollo de los linfocitos T, puede contribuir a la generación de la T-ALL como consecuencia de la desregulación de la vía de NOTCH1. Además, en momentos más avanzados de la enfermedad, la ausencia de *SFRP1* puede promover la progresión y expansión tumoral debido a su contribución en el mantenimiento de la activación constitutiva de la vía de NOTCH1. Por tanto, *SFRP1* constituye una prometedora diana terapéutica para el tratamiento de la T-ALL dependiente de NOTCH1.

A

Cromosoma	Inicio	Fin	pValor	Dif. Metilación
8	41166357	41166358	1,72E+09	0.31
8	41166620	41166792	1,83E-45	0.68
8	41167053	41167083	1,96E-10	0.59
8	41166032	41166033	2,51E+08	0.46
8	41166046	41166064	2,81E-05	0.61
8	41165859	41165904	3,17E-10	0.62
8	41164306	41164515	3,39E+08	0.56
8	41166066	41166335	5,17E-103	0.65
8	41166792	41166876	6,14E-42	0.54
8	41165910	41166012	6,32E-18	0.64
8	41167049	41167053	6,40E+09	0.58
8	41167045	41167049	6,60E+04	0.61
8	41166358	41166360	8,95E+09	0.68
8	41166877	41167029	9,24E-114	0.7
8	41168336	41168894	9,53E+05	0.35

B



**Figura 38. Regulación epigenética del gen *SFRP1* en leucemias primarias de pacientes diagnosticados de T-ALL.** (A) Tabla con las coordenadas de las regiones significativamente hipermetiladas encontradas en una cohorte de 23 leucemias primarias de pacientes de T-ALL comparadas con la metilación presente en 10 muestras de células T normales. Se muestra la significación estadística de cada región (B) Representación de las 15 regiones significativamente hipermetiladas mostradas en A.

# DISCUSIÓN

Diversos estudios han señalado la implicación de Notch1 durante el proceso de diferenciación de los linfocitos T, siendo necesario para la especificación de linaje T en los progenitores hematopoyéticos con potencial linfomieloide que llegan al timo (De Smedt et al., 2002; Garcia-Peydro et al., 2006; Pui et al., 1999; Radtke et al., 1999), el proceso de selección- $\beta$  (Maillard et al., 2006) y la proliferación y supervivencia dependiente del IL-7R durante los primeros estadios de diferenciación (Peschon et al., 1994; Plum et al., 1996). Por otro lado, la activación constitutiva de Notch1 es crucial en la fisiopatología de una gran proporción de leucemias T-ALL, promoviendo la proliferación y supervivencia de las células leucémicas (Palomero et al., 2006b; Weng, 2004). En este trabajo demostramos que Sfrp1 es capaz de regular Notch1 tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, aportando un nuevo mecanismo regulador de la activación de Notch1 en células T. Este nuevo mecanismo de regulación, junto con las funciones previamente descritas de Notch1 durante el desarrollo de los linfocitos T y en la fisiopatología de la T-ALL, aporta una información crucial para comprender aún mejor la regulación de la vía de Notch1 en estos sistemas.

## **1. Función de Sfrp1 durante desarrollo fisiológico de los linfocitos T de ratón.**

Durante el proceso de diferenciación T se produce la migración de los timocitos DN desde la CMJ hacia la SCZ, proceso durante el cual las células van diferenciándose hasta llegar a la SCZ, región donde tiene lugar la selección- $\beta$  de los timocitos en el estadio DN3. Una vez superada la selección- $\beta$ , los timocitos DN4 y posteriormente, DP, migran a través de la corteza y la CMJ hasta la médula, región en la que las células SP serán seleccionadas para formar el repertorio de células T maduras que migran a la periferia (Ciofani and Zúñiga-Pflücker, 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que en el timo embrionario de ratón (E15,5), cuando las diferentes regiones intratímicas no se encuentran totalmente definidas y prácticamente la totalidad de las células T que residen en él son DN, la expresión de Sfrp1 es homogénea. Asimismo, el patrón de expresión de Hes1, diana transcripcional de Notch1, es similar en este estadio embrionario, sugiriendo que Sfrp1 podría regular la activación de la vía de Notch1 durante los estadios DN de la diferenciación T, en los cuales, especialmente en DN2 y DN3, la expresión de Notch1 es mayor (Taghon et al., 2006; Yashiro-Ohtani et al., 2014).

Por otro lado, en timos neonatales en los que las regiones intratímicas ya se encuentran totalmente definidas, observamos un gradiente de expresión de *Sfrp1* desde la SCZ hacia la médula, coincidiendo con la localización de las poblaciones DN en esta región (Ciofani and Zúñiga-Pflücker, 2007). Este gradiente de expresión de *Sfrp1* parece ser esencial para regular los niveles de activación de Notch1, debido a que en ausencia de *Sfrp1* existe un aumento en la expresión de la diana de Notch1, *Hes1*, principalmente en la SCZ. En este escenario, podríamos concluir que *Sfrp1* es capaz de modular la activación de Notch1 en el timo de ratón, pudiendo influir en el proceso madurativo de los linfocitos T, especialmente en las poblaciones DN.

La regulación de la expresión de Notch1 durante el proceso de diferenciación T se produce de manera estadio-específico. Su expresión incrementa de forma progresiva desde los progenitores más tempranos hasta la selección- $\beta$  (Ciofani et al., 2006), tras la cual los niveles de Notch1 disminuyen drásticamente (Taghon et al., 2006; Yashiro-Ohtani et al., 2009). Nuestro estudio de las poblaciones DN presentes en embriones de E15,5 demuestra que en ausencia de *Sfrp1* se produce un incremento en el número de células totales en momentos tempranos del desarrollo, que afecta a las poblaciones DN y a la población CD8ISP. La expansión de las poblaciones DN además del incremento de *Hes1* en la SCZ en los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup>, sugiere que *Sfrp1* pueda ejercer una función selectiva durante el proceso de selección- $\beta$ , que ocurre durante la transición DN3-DN4, e induce la supervivencia de los timocitos DN3 seleccionados de forma dependiente de Notch1 (Maillard et al., 2006). Asimismo, nuestro estudio demuestra que el proceso de selección- $\beta$  se encuentra ligeramente afectado en ausencia de *Sfrp1*, debido a que se produce un incremento selectivo en la proporción de la población DN3<sub>b</sub>. No obstante, ambas poblaciones, DN3<sub>a</sub> y DN3<sub>b</sub>, se expanden por igual en términos absolutos, indicando que la ausencia de *Sfrp1* también induce la expansión de las poblaciones previas al proceso de selección- $\beta$ .

La función estadio-específica del IL-7R se lleva a cabo mediante la regulación dinámica de su expresión, que ocurre de manera similar a la regulación de Notch1, dado que la cadena alfa del IL-7R es una diana transcripcional directa de la vía de Notch1, tanto en humanos (González-García et al., 2009) como en ratón (Mosquera et al., en preparación). Esta regulación dinámica del IL-7R permite la optimización de la respuesta frente a las cantidades limitantes de IL-7 presentes en el timo. Además, la señalización a través del IL-7R es crítica durante los estadios DN2 y DN3, induciendo la proliferación

y supervivencia de estas poblaciones (Peschon et al., 1994; Plum et al., 1996). Nuestros datos muestran que la ausencia de *Sfrp1* regula la expresión del IL7R, probablemente por la modulación de la activación de Notch1, traducándose en la expansión de las poblaciones DN en E15,5. Igualmente, tanto el número de células totales como la expresión del IL-7R se encuentran aumentadas en la población CD8ISP en ausencia de *Sfrp1*, población en la cual la expresión del IL-7R y de Notch1 son prácticamente inexistentes en condiciones normales (Yu et al., 2004). De hecho, los mecanismos por los cuales disminuye la activación de la vía de Notch1 después de la selección- $\beta$  no están claros, debido a que la cantidad de receptor que se encuentra en la membrana celular sigue siendo alta desde el estadio DN3 hasta el estadio CD8ISP, bajando únicamente en las células DP (Fiorini et al., 2009). Esto implica la existencia de mecanismos que regulen de forma negativa la activación de Notch1 en la membrana celular o a nivel de sus genes diana, pudiendo estar regulado por *Sfrp1* en la población CD8ISP, debido a que en su ausencia observamos un aumento tanto en los números totales de la población como en la expresión del IL-7R.

Sin embargo, nuestro estudio no demuestra de forma directa que el incremento de la expresión del IL-7R sea responsable del incremento observado en la proliferación, debido a que todas las poblaciones presentes en el timo embrionario a E15,5 presentaban tasas de proliferación normales. No obstante, se ha descrito que la producción de IL-7 en el timo también se encuentra regulada durante la ontogenia. En el timo en desarrollo, la producción de IL-7 comienza en E12, con un pico de máxima producción a E15 y una bajada de la producción durante los siguientes cinco días (Moore et al., 1993; Wiles et al., 1992). Estas observaciones concuerdan con el incremento observado en los números de células totales que han incorporado BrdU, presentes en todas las subpoblaciones del timo de los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup>, pudiendo coincidir la expansión celular con el pico de máxima producción de IL-7 (E15). Por tanto, los estudios de proliferación sugieren que la expansión observada en las poblaciones intratímicas se produjo en momentos del desarrollo anteriores a E15,5, cuando los niveles de IL-7 endógena son máximos. Por otro lado, no podemos descartar la influencia de la vía Wnt en esta expansión, estudios realizados en ratones deficientes en *Wnt1* y *Wnt4* así como con el inhibidor de la vía de Wnt *Dkk1*, demostraron que la señalización a través de Wnt es necesaria para la proliferación de las poblaciones DN (Mulroy et al., 2002; Weerkamp et al., 2006), por tanto, la ausencia de *Sfrp1* podría promover un aumento en la expansión de estas poblaciones.



El efecto de la ausencia de *Sfrp1* en etapas posteriores de la diferenciación T (E16,5) es el opuesto, presentando un impedimento de la expansión celular asociada a la aparición de la población DP (Xiao et al., 2003). En concreto, la transición CD8ISP-DP se encuentra especialmente afectada durante la progresión de E15,5 a E16,5, encontrando una expansión celular de 100 veces en los timos wt frente a 2 veces en los timos mutantes. Este defecto en la expansión celular parece estar asociado al aumento en la apoptosis de todas las poblaciones presentes a E15,5, indicando que *Sfrp1* podría regular el proceso de apoptosis durante la diferenciación de los linfocitos T de ratón. Asimismo, se ha demostrado que los niveles de IL-7R deben de estar regulados de manera crítica durante los distintos estadios de diferenciación. Ratones transgénicos que sobre-expresan IL-7Rα bajo el promotor de CD2 humano y, por tanto, muestran una expresión del transgen específica en células T, presentan una hipoplasia tímica y una reducción del número total de timocitos debido al aumento de la apoptosis por la competición entre los timocitos DN y DP por las cantidades limitantes de IL-7 presentes en el timo (Munitic et al., 2004). De forma similar, las poblaciones presentes en los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> que poseen un aumento del IL-7R en membrana, presentan un incremento en la apoptosis a E15,5. Este aumento en la apoptosis podría deberse a la cantidad limitante de IL-7 en el timo, provocando, de la misma forma que en los ratones transgénicos, una competición entre las distintas sub-poblaciones DN y la población CD8ISP. Además, a pesar de que *Sfrp1* es capaz de modular la vía de Wnt, los efectos observados a E16,5 no pueden atribuirse a una modulación de esta vía. Se ha descrito que la inhibición de la vía de Wnt genera un bloqueo completo de la diferenciación T en el estadio CD8ISP (Okamura et al., 1998; Pongracz et al., 2006) y una disminución en la supervivencia de los timocitos DP (Hossain et al., 2008; Xie et al., 2005), esperando el efecto contrario en ausencia de *Sfrp1*. Por tanto, el aumento de la apoptosis celular a E15,5 y el impedimento de la expansión de la población CD8ISP a E16,5, induce un bloqueo parcial del programa de diferenciación T en el tránsito hacia el estadio DP. Esta desregulación de las poblaciones más tempranas, se traduce en una deficiencia en la expansión de la población DP y en la generación de timocitos maduros SP en momentos tempranos del desarrollo y de la vida postnatal de los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup>.

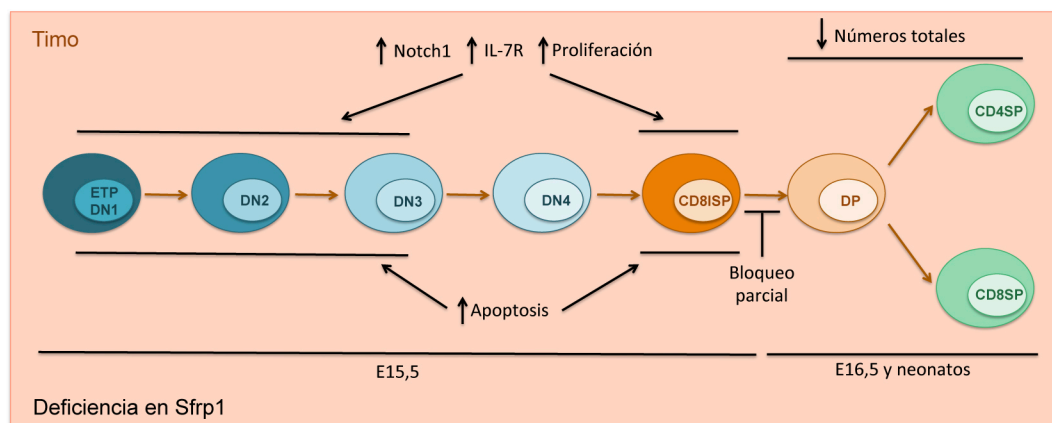
Por otro lado, debido a que a E16,5 los niveles de expresión del IL-7R son normales, no podemos descartar que estén actuando mecanismos que permiten maximizar la disponibilidad de IL-7 por las células T para garantizar así homeostasis de los timocitos, es la llamada “hipótesis altruista” del consumo de la IL-7 (Mazzucchelli and

Durum, 2007). Esta hipótesis plantea la posibilidad de que dichos mecanismos limitan la expresión del IL-7R $\alpha$  en la superficie de las células T tras su estimulación con IL-7 mediante la supresión de la transcripción del *Il7ra* (Park et al., 2004) y la endocitosis del IL-7R $\alpha$  (Henriques et al., 2010). De acuerdo con esta hipótesis, planteamos que la ausencia de *Sfrp1* aumenta la activación de Notch1 y por consiguiente la expresión del IL-7R, receptor que tras el pico de estimulación de IL-7 a E15 se produce la supresión de su transcripción y la endocitosis del IL-7R $\alpha$ , volviendo a los niveles normales de expresión del IL-7R a E16,5.

Los datos obtenidos en este estudio revelan que en los ratones *Sfrp1*<sup>-/-</sup> se produce un sucesivo agotamiento de los progenitores más inmaduros DN1, que resulta evidente en momentos postnatales más tardíos. Asimismo, se ha descrito que la población de progenitores DN1 es necesario que se divida varias veces antes de progresar al siguiente estadio madurativo (Manesso et al., 2013); por tanto, la ausencia de *Sfrp1* durante los primeros momentos de la diferenciación T (E15,5) podría acelerar este proceso, contribuyendo al incremento en los números de los siguientes estadios madurativos y manteniendo normales los números de la población DN1. Por otro lado, el agotamiento de la población DN1 observado en momentos posteriores de la diferenciación T probablemente se deba a la gran proliferación observada durante los primeros estadios embrionarios y a su maduración continuada para reponer el compartimento de células DP y SP, que finalmente alcanzan números normales en los ratones adultos. Se ha descrito que la expresión de *Sfrp1* incrementa la proliferación de las HSCs, además de promover su diferenciación y disminuir su capacidad de repoblación al ser trasplantadas en un nuevo hospedador (Nakajima et al., 2009; Renström et al., 2009). Por tanto, la deficiencia de *Sfrp1* podría disminuir la capacidad proliferativa de los progenitores intratímicos más tempranos y además aumentar su capacidad de repoblación hasta alcanzar los niveles de células normales durante la etapa post-natal, a expensas de su agotamiento.

En resumen, proponemos que, *Sfrp1* contribuye a regular los niveles de Notch1 durante los primeros estadios de la diferenciación T y por tanto, a regular sus genes diana, como el IL-7R y como consecuencia los procesos en los que están implicados como la proliferación dependiente de IL-7 (**Figura 39**). Por otro lado, no parece que *Sfrp1* desempeñe una función esencial en etapas tardías de la diferenciación intratímica que determinan la generación de los timocitos TCR $\alpha\beta$  a partir de timocitos pre-T, ni en

los posteriores procesos de selección positiva y negativa que acontecen en el timo, debido principalmente a que estas poblaciones no expresan el receptor Notch1 en la membrana celular (Fiorini et al., 2009).



**Figura 39.** Función de Sfrp1 durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo.

## 2. Regulación de NOTCH1 por SFRP1 y su implicación en la patogénesis de la leucemia T linfoblástica aguda.

Nuestro hallazgo sobre la regulación de Notch1 por Sfrp1 en el desarrollo intratímico sugirió que esta función podría tener relevancia patológica en el contexto de la generación y/o expansión de la leucemia T-ALL. Para estudiar esta posibilidad, quisimos analizar si la T-ALL dependiente de mutaciones activadoras de NOTCH1, podría ser objeto de un mecanismo de regulación similar por SFRP1. Este es un aspecto de relevancia clínica, ya que más del 60% de las T-ALL presentan mutaciones activadoras en *NOTCH1*, siendo las más frecuentes aquellas que confieren independencia o hipersensibilidad a la unión de ligando, como las que se localizan en el dominio HD (Weng, 2004). Desde su descubrimiento, ha existido un interés creciente en el desarrollo de terapias anti-NOTCH1, que se han centrado sobre todo en inhibir el complejo  $\gamma$ -secretasa mediante la utilización de GSI (Palomero et al., 2006b; Weng, 2004). Los resultados del presente estudio permiten extender las posibles terapias inhibitoras a otro complejo enzimático esencial en el procesamiento y la activación de los receptores NOTCH. Como se ha demostrado en otros sistemas (Esteve et al., 2011; Oldefest et al., 2015), SFRP1 modula negativamente la activación de NOTCH1 en leucemias T-ALL con mutaciones en el dominio HD, impidiendo el corte proteolítico mediado por las metaloproteasas ADAM. Estudios previos han mostrado que el dominio

CRD de SFRP1 es suficiente para ejercer su función inhibitoria sobre la vía de Wnt (Bhat et al., 2007). Sin embargo, nuestros datos indican que la modulación ejercida sobre la vía de NOTCH1 requiere la participación de la molécula SFRP1 completa. La estructura que poseen las ADAMs encargadas de activar la vía de NOTCH1 (ADAM10 y ADAM17) comprende los dominios catalítico y desintegrina, junto a los cuales se sitúa un dominio rico en cisteínas, cuya función se cree que es la de mediar la interacción con otras moléculas (Edwards et al., 2008). Un modelo hipotético de actuación sería que la unión entre los dominios ricos en cisteínas de SFRP1 y ADAM fuera responsable de la interacción SFRP1-ADAM, lo que acercaría el dominio NTR de SFRP1 al sitio catalítico de ADAM, impidiendo de esta forma la actividad metaloproteasa. En el caso de que la proteína SFRP1 se encontrara fragmentada, el dominio CRD continuaría uniéndose al dominio rico en cisteínas de ADAM, siendo incapaz de modular la actividad metaloproteasa al carecer del dominio NTR, generando de esta manera una competición entre el fragmento CRD de SFRP1 con la proteína completa (Esteve et al., 2011).

Se ha demostrado que tanto ADAM10 como ADAM17 están implicadas en la activación de la vía de NOTCH1. ADAM10 sería la principal metaloproteasa implicada en el corte proteolítico de NOTCH1 durante el desarrollo de los linfocitos T, ya que los ratones deficientes en *Adam10* muestran un bloqueo en la diferenciación T similar al que ocurre en los ratones *Notch1*<sup>-/-</sup> (Tian et al., 2008). Por el contrario, ADAM17 sólo desempeñaría esta función en condiciones patológicas como las T-ALL, en las que el corte proteolítico mediado por las ADAM se produce en ausencia de ligando (Bozkulak and Weinmaster, 2009; Sulis et al., 2011), ya que los ratones deficientes para ADAM17 no presentan defectos en la diferenciación T (Peschon et al., 1998). No obstante, nuestros datos demuestran que en líneas celulares T-ALL con mutaciones en el dominio HD de *NOTCH1*, tanto ADAM10 como ADAM17 participan en la activación de la vía de NOTCH1. Aunque el ensayo funcional utilizado, no distingue entre las diferentes ADAM que son inhibidas por SFRP1, nuestros resultados utilizando inhibidores farmacológicos sugieren que únicamente ADAM10 es inhibida por SFRP1, o al menos se inhibe más eficientemente que la metaloproteasa ADAM17. En consecuencia, Sfrp1 ejercería asimismo su efecto inhibitorio sobre Adam10 en el timo, siendo esta metaloproteasa la implicada en modular la activación de Notch1 durante el desarrollo de los linfocitos T.

La función de SFRP1 como inhibidor de ADAM10 en T-ALL es especialmente relevante considerando que diversas ADAM se sobre-expresan en tumores malignos

(Murphy, 2008) y participan en la patología de los cánceres. Las ADAM facilitan el crecimiento celular y la invasión, gracias a su papel regulador de diversos factores de crecimiento e integrinas, que a su vez regulan la interacción del tumor con su microambiente tumoral. Por ejemplo, la sobre-expresión de SFRP1 impide el proceso de metástasis en el cáncer de pulmón, induciendo cambios en los componentes de la matriz extracelular (Matsuda et al., 2009). Además, es conocido que SFRP1 modula la señalización de la vía de Wnt- $\beta$ -catenina implicada en un amplio rango de tumores. En este escenario, es esperable que SFRP1, aunque no se ha confirmado para otros miembros de la familia, tenga una reconocida función como factor supresor de tumores, mientras que la pérdida de expresión de *SFRP1*, principalmente por hipermetilación, sea un factor recurrente en diversos cánceres (Vincent and Postovit, 2017). Por tanto, el tratamiento con SFRP1 se vislumbra como una posible estrategia de intervención terapéutica en diferentes tipos tumorales, incluyendo las T-ALL. Nuestros resultados en líneas celulares T-ALL con mutaciones en el dominio HD de *NOTCH1* demuestran que la producción autocrina de SFRP1 reduce la activación de NOTCH1 y la expresión de sus genes diana, lo que se acompaña de una reducción tanto de la proliferación *in vitro* como de la progresión tumoral *in vivo*. La inhibición de NOTCH1 por GSI en líneas celulares T-ALL induce asimismo una parada en la fase G1 del ciclo celular (Palomero et al., 2006b; Weng, 2004), y previene la progresión de las leucemias T-ALL primarias *in vivo*, lo que confirma la relevancia de la vía de NOTCH1 en el mantenimiento de la actividad iniciadora de leucemia o LIC (del inglés, *Leukemia Initiating Cell*) y en la auto-renovación de las células madre cancerosas o CSCs (del inglés, *Cancer Stem Cells*) de la T-ALL (Armstrong et al., 2009; Tatarek et al., 2011). Nuestros resultados utilizando líneas celulares indican que la inhibición de NOTCH1 por sobre-expresión de SFRP1 también previene la progresión tumoral *in vivo*, lo que confirma la función de SFRP1 como supresor de tumores en T-ALL y su posible relevancia para el desarrollo de futuras estrategias terapéuticas frente a esta patología. No obstante, en nuestro modelo de xenotrasplante de leucemias primarias que expresan ectópicamente *SFRP1* no hemos podido confirmar la inhibición de la progresión leucémica *in vivo*, lo que sugiere que las concentraciones de la proteína producidas localmente no son suficientes para ejercer su efecto inhibitor. Por tanto, se requieren estudios adicionales utilizando métodos alternativos de administración sistémica, dirigidos a incrementar la eficiencia de la función de SFRP1 en el microambiente tumoral, que proporcionen la prueba de concepto de la relevancia de SFRP1 como inhibidor de la T-ALL en pacientes.

### 3. Implicación de SFRP1 en la patogénesis de la leucemia T linfoblástica aguda.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la expresión de SFRP1 debe ser esencial durante el desarrollo intratímico, para regular los niveles de activación de NOTCH1 en los progenitores y, por tanto, controlar la generación de patologías como la T-ALL. De hecho, estudios previos han descrito que la pérdida de expresión de SFRP1 se produce frecuentemente en diferentes tumores, provocando un aumento en la proliferación y la expansión de las células tumorales (Matsuda et al., 2009). Sin embargo, en nuestro modelo experimental, los ratones deficientes en *Sfrp1* no generaron T-ALL, u otros tipos de tumor, durante un periodo de observación de un año, por lo que es posible que sea necesario el concurso de otras mutaciones en la generación tumoral *in vivo*. Por ello, para explorar de forma directa la contribución de SFRP1 a la patogénesis de la T-ALL decidimos analizar la frecuencia de mutaciones, así como la regulación por metilación del gen en una cohorte de leucemias T-ALL primarias, demostrando que la principal causa de pérdida de la expresión de *SFRP1* en T-ALL es su silenciamiento epigenético; aunque existe también una baja prevalencia de mutaciones (4%). Por tanto, estos datos extienden a la T-ALL la relevancia patogénica de SFRP1.

El potencial oncogénico de las mutaciones activadoras localizadas en el dominio HD de *NOTCH1* identificadas en pacientes con T-ALL, es insuficientes para generar una T-ALL cuando se *sobre*-expresan en progenitores de ratón (Pear et al., 1996). No obstante, estas mutaciones dan lugar a una señalización aberrante de NOTCH1, que representa un evento pre-leucémico en la patogénesis de la enfermedad; ya que se ha demostrado que la población pre-leucémica genera finalmente una población leucémica en la que aparecen mutaciones cooperadoras adicionales (Chiang et al., 2008; Eguchi-Ishimae et al., 2007). La modificación de estas mutaciones para convertirlas en mutaciones activadoras fuertes induce directamente la generación de leucemia (Pear et al., 1996), lo que demuestra que la fuerza de la señalización vía NOTCH1 es determinante para la generación de T-ALL, al menos en ratón. En este contexto, el silenciamiento de *SFRP1* y, en consecuencia, el mantenimiento de la actividad de la metaloproteasa ADAM10, potenciaría la activación de NOTCH1, contribuyendo a la generación de T-ALL. Considerando que las mutaciones en el dominio HD de *NOTCH1*, además de expandir la población susceptible de sufrir mutaciones adicionales, inducen

la proliferación y supervivencia de las células con actividad LIC de la T-ALL (Chiang et al., 2008; Lin et al., 2006), SFRP1 se vislumbra como una prometedora diana terapéutica para el tratamiento de este tipo de leucemias.

#### **4. Nuevas perspectivas terapéuticas en el tratamiento de la T-ALL.**

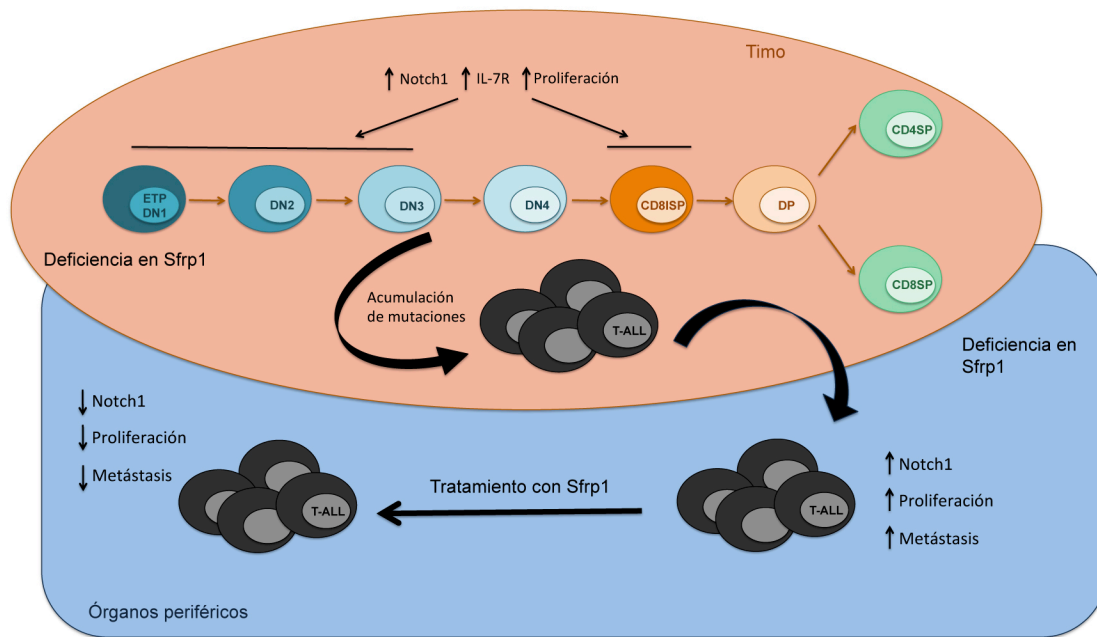
El pronóstico de los pacientes de T-ALL ha mejorado en los últimos años gracias al desarrollo de tratamientos de quimioterapia intensiva, con tasas de supervivencia del 75% en niños y del 50% en adultos (Pui et al., 2008). Sin embargo, la tasa de recaídas sigue siendo alta y el pronóstico de estos pacientes grave, por lo que es necesario el desarrollo de nuevas terapias que permitan mejorar la supervivencia de los pacientes de T-ALL. Desde que en 2004 se describió que más del 60% de las T-ALL poseen mutaciones activadoras en el gen *NOTCH1* (Weng, 2004), el esfuerzo se ha centrado en inhibir esta vía de señalización. Los inhibidores GSI provocan una disminución tanto en los niveles de la forma activa ICN1 de NOTCH1 como de sus genes diana, que se traduce en una inhibición del ciclo celular y del tamaño de las células tumorales (Palomero et al., 2006b; 2006a; Weng, 2004). Estos prometedores resultados promovieron el lanzamiento de ensayos clínicos para analizar la efectividad del GSI en pacientes. Sin embargo, la gran toxicidad intestinal que genera el GSI ha forzado el desarrollo de terapias anti-NOTCH1 alternativas, como el uso de péptidos MAML1 dominantes negativos o anticuerpos específicos contra NOTCH1 (Weng, 2004; Weng et al., 2003; Wu et al., 2010). En este escenario, el desarrollo de modelos preclínicos humanos que evalúen la eficacia del tratamiento terapéutico con SFRP1 en ratones inmunodeficientes xenotrasplantados con T-ALLs humanas, es una prioridad que permitirá desarrollar nuevas . Uno de los posibles efectos adversos de este abordaje terapéutico podría ser la respuesta inflamatoria derivada de la inducción de células Th17 por parte de SFRP1 (Lee et al., 2012). No obstante, el papel de las células Th17 en el microambiente tumoral es controvertido, existiendo evidencias del papel anti-tumoral ejercido por la respuesta inflamatoria inducida por las células Th17 (Zou and Restifo, 2010), siendo necesarios estudios adicionales para dilucidar este aspecto. Por tanto, en este estudio proponemos que la administración de SFRP1 podría ayudar al tratamiento de leucemias T-ALL con mutaciones en el dominio HD de *NOTCH1*, incrementando la eficacia de las terapias combinadas contra este tipo de cáncer.

## 5. Modelo propuesto de la función de Sfrp1 durante el desarrollo T y la fisiopatología de la T-ALL.

En conjunto nuestros resultados permiten proponer un modelo sobre el mecanismo de acción de Sfrp1 durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo y en el proceso de mantenimiento y generación de la T-ALL, que se ilustra en la **Figura 40**. Según este modelo, durante la diferenciación en el timo, Sfrp1 contribuiría al mantenimiento de los niveles normales de activación de Notch1, modulando negativamente la actividad de la metaloproteasa ADAM10. Sin embargo, en condiciones patológicas en las que se produjera la pérdida de la expresión de Sfrp1, los niveles de activación de Notch1 se incrementarían en las poblaciones DN presentes en el timo. Como consecuencia se induciría la expresión aberrante del IL-7R con niveles de receptor superiores a los fisiológicos y la consecuente expansión de estas células dependiente de IL-7, incrementando la población de progenitores susceptibles de sufrir mutaciones adicionales. En el caso en que el silenciamiento de Sfrp1 se combinara con una mutación en el dominio HD de *NOTCH1*, este efecto pre-leucémico sería aún más acusado, aumentando la probabilidad de generación de una leucemia T-ALL.

Además, en condiciones patológicas, la ausencia de Sfrp1 podría incrementar la capacidad de invasión de otros tejidos, a través de la regulación de las metaloproteasas ADAM presentes en la matriz extracelular. Por ello, la administración de Sfrp1 como tratamiento en T-ALL podría desempeñar un papel dual, disminuyendo la proliferación dependiente de Notch1 y la capacidad metastásica mediada por la remodelación de la matriz extracelular.





**Figura 40.** Modelo hipotético del papel de Sfrp1 durante la patogénesis y el tratamiento de leucemias T-ALL dependientes de Notch1.

# CONCLUSIONES

1. Sfrp1 se expresa en el timo de ratón principalmente en los timocitos situados en la SCZ, región en la que se produce la selección- $\beta$ .
2. La ausencia de Sfrp1 incrementa la expresión de Hes1, una de las principales dianas de Notch1, en el timo de ratón, lo que indica que Sfrp1 inhibe la activación de Notch1.
3. La deficiencia de Sfrp1 provoca un aumento del número de progenitores intratímicos DN en etapas embrionarias previas al inicio del proceso de selección- $\beta$ , lo que se correlaciona con un incremento en la expresión del IL7-R, una importante diana de Notch1.
4. La deficiencia de Sfrp1 induce un incremento en la apoptosis los progenitores DN embrionarios, que resulta en una inhibición de su expansión durante la progresión de E15,5 a E16,5.
5. Sfrp1 es esencial para la expansión celular que acompaña al proceso de selección- $\beta$ . Su deficiencia provoca una marcada inhibición de la generación de timocitos post-selección- $\beta$  CD8ISP y DP que ocurre durante la progresión de E15,5 a E16,5, lo que resulta en un bloqueo de la transición DN-DP.
6. La inhibición de la transición DN-DP en los embriones deficientes en Sfrp1 impide la generación de timocitos maduros SP en el timo neonatal. Este defecto se compensa en la vida adulta, pero se acompaña de una disminución progresiva de los progenitores intratímicos más tempranos DN1.
7. SFRP1 inhibe la activación de NOTCH1 en líneas celulares y leucemias primarias humanas T-ALL portadoras de mutaciones activadoras en el dominio HD de NOTCH1.
8. SFRP1 inhibe la actividad de las metaloproteasas de la familia ADAM (ADAM9, ADAM10, ADAM17), por lo que la inhibición de ADAM10/17 puede ser el mecanismo responsable de la inactivación de NOTCH1 por SFRP1.

9. SFRP1 impide la proliferación *in vitro* y la progresión *in vivo* de líneas celulares T-ALL, por lo que se revela como una posible diana terapéutica para el tratamiento de la T-ALL.
10. El gen *SFRP1* se encuentra mutado en un 4% de las leucemias T-ALL analizadas. Además, se han identificado modificaciones epigenéticas en quince regiones distintas de *SFRP1* en el 30-70% de las leucemias T-ALL analizadas, lo que confirma la implicación de SFRP1 en la patogénesis de la T-ALL.

# BIBLIOGRAFÍA

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997).  $\beta$ -catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway. *EMBO Journal* *16*, 3797–3804.
- Adler, S.H., Chiffolleau, E., Xu, L., Dalton, N.M., Burg, J.M., Wells, A.D., Wolfe, M.S., Turka, L.A., and Pear, W.S. (2003). Notch signaling augments T cell responsiveness by enhancing CD25 expression. *The Journal of Immunology* *171*, 2896–2903.
- Allman, D., Karnell, F.G., Punt, J.A., Bakkour, S., Xu, L., Myung, P., Koretzky, G.A., Pui, J.C., Aster, J.C., and Pear, W.S. (2001). Separation of Notch1 Promoted Lineage Commitment and Expansion/Transformation in Developing T Cells. *J Exp Med* *194*, 99–106.
- Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J.P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A., and Bhandoola, A. (2003). Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol* *4*, 168–174.
- Amsen, D., and Kruisbeek, A.M. (1998). Thymocyte selection: not by TCR alone. *Immunological Reviews* *165*, 209–299.
- Armstrong, F., la Grange, de, P.B., Gerby, B., Rouyez, M.-C., Calvo, J., Fontenay, M., Boissel, N., Dombret, H., Baruchel, A., Landman-Parker, J., et al. (2009). NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood* *13*, 1730–1740.
- Artavanis-Tsakonas, S. (1999). Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* *284*, 770–776.
- Bell, J.J., and Bhandoola, A. (2008). The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature* *452*, 764–767.
- Belver, L., and Ferrando, A. (2016). The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Publishing Group* *16*, 494–507.
- Bene, M.C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A., and Veer, M.V. (1995). Proposal for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* *9*, 1783–1786.
- Besseyrias, V., Fiorini, E., Strobl, L.J., Zimmer-Strobl, U., Dumortier, A., Koch, U., Arcangeli, M.L., Ezine, S., MacDonald, H.R., and Radtke, F. (2007). Hierarchy of Notch-Delta interactions promoting T cell lineage commitment and maturation. *J Exp Med* *204*, 331–343.
- Bhandoola, A., Boehmer, von, H., Petrie, H.T., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2007). Commitment and Developmental Potential of Extrathymic and Intrathymic T Cell Precursors: Plenty to Choose from. *Immunity* *26*, 678–689.
- Bhat, R.A., Stauffer, B., Komm, B.S., and Bodine, P.V.N. (2007). Structure–Function analysis of secreted frizzled-related protein-1 for its Wnt antagonist function. *J. Cell. Biochem.* *102*, 1519–1528.
- Blaumueller, C.M., Qi, H., and Artavanis-Tsakona, S. (1997). Intracellular Cleavage of Notch Leads to a Heterodimeric Receptor on the Plasma Membrane. *Cell* *90*, 281–291.
- Boehmer, von, H., Aifantis, I., Azogui, O., Feinberg, J., Saint-Ruf, C., Zober, C., Garcia, C., and Buer, J. (1998). Crucial function of the pre-T-cell receptor (TCR) in TCR $\beta$

selection, TCR $\beta$  allelic exclusion and  $\alpha\beta$  versus  $\gamma\delta$  lineage commitment. *Immunological Reviews* 165, 111–119.

Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J.M., Cisneros, E., and Lopez-Rios, J. (2008). Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *Journal of Cell Science* 121, 737–746.

Bozkulak, E.C., and Weinmaster, G. (2009). Selective Use of ADAM10 and ADAM17 in Activation of Notch1 Signaling. *Molecular and Cellular Biology* 29, 5679–5695.

Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., and Israël, A. (2000). A Novel Proteolytic Cleavage Involved in Notch Signaling: The Role of the Disintegrin-Metalloprotease TACE. *Molecular Cell* 5, 202–216.

Brunk, F., Augustin, I., Meister, M., Boutros, M., and Kyewski, B. (2015). Thymic Epithelial Cells Are a Nonredundant Source of Wnt Ligands for Thymus Development. *The Journal of Immunology* 195.

Brückner, K., Perez, L., Clausen, H., and Cohen, S. (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* 406, 411–415.

Burtrum, D.B., Kim, S., Dudley, E.C., Hayday, A.C., and Petrie, H.T. (1996). TCR gene recombination and alpha beta-gamma delta lineage divergence: productive TCR-beta rearrangement is neither exclusive nor preclusive of gamma delta cell development. *The Journal of Immunology* 157, 4293–4296.

Chiang, M.Y., Xu, L., Shestova, O., Histen, G., L'Heureux, S., Romany, C., Childs, M.E., Gimotty, P.A., Aster, J.C., and Pear, W.S. (2008). Leukemia-associated NOTCH1 alleles are weak tumor initiators but accelerate K-ras-initiated leukemia. *J. Clin. Invest.* 118, 3181–3194.

Chong, J.M., Uren, A., Rubin, J.S., and Speicher, D.W. (2002). Disulfide Bond Assignments of Secreted Frizzled-related Protein-1 Provide Insights about Frizzled Homology and Netrin Modules. *Journal of Biological Chemistry* 277, 5134–5144.

Chung, M.-T., Lai, H.-C., Sytwu, H.-K., Yan, M.-D., Shih, Y.-L., Chang, C.-C., Yu, M.-H., Liu, H.-S., Chu, D.-W., and Lin, Y.-W. (2009). SFRP1 and SFRP2 suppress the transformation and invasion abilities of cervical cancer cells through Wnt signal pathway. *Gynecologic Oncology* 112, 646–653.

Ciofani, M., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2007). The Thymus as an Inductive Site for T Lymphopoiesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 463–493.

Ciofani, M., Knowles, G.C., Wiest, D.L., Boehmer, von, H., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2006). Stage-Specific and Differential Notch Dependency at the  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T Lineage Bifurcation. *Immunity* 25, 105–116.

Cobas, M., Wilson, A., Ernst, B., Mancini, S.J.C., MacDonald, H.R., Kemler, R., and Radtke, F. (2004). Beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *J Exp Med* 199, 221–229.

D'Souza, B., Miyamoto, A., and Weinmaster, G. (2008). The many facets of Notch ligands. *Oncogene* 27, 5148–5167.

De Obaldia, M.E., Bell, J.J., Wang, X., Harly, C., Yashiro-Ohtani, Y., DeLong, J.H., Zlotoff, D.A., Sultana, D.A., Pear, W.S., and Bhandoola, A. (2013). T cell development requires constraint of the myeloid regulator C/EBP- $\alpha$  by the Notch target and transcriptional repressor Hes1. *Nat Immunol* 14, 1277–1284.

De Smedt, M., Reynvoet, K., Kerre, T., Taghon, T., Verhasselt, B., Vandekerckhove, B., Leclercq, G., and Plum, J. (2002). Active form of Notch imposes T cell fate in human progenitor cells. *The Journal of Immunology* 169, 3021–3029.

DeAngelo, D.J., Stone, R.M., Heaney, M.L., Nimer, S.D., Paquette, R.L., Klisovic, R.B., Caligiuri, M.A., Cooper, M.R., Lecerf, J.M., Karol, M.D., et al. (2006). Phase 1 clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Blood* 108, 3674–3681.

Deftos, M.L., Huang, E., Ojala, E.W., Forbush, K.A., and Bevan, M.J. (2000). Notch1 Signaling Promotes the Maturation of CD4 and CD8 SP Thymocytes. *Immunity* 13, 73–84.

Drexler, H.G., Gaedicke, G., and Minowada, J. (1985). ISOENZYME STUDIES IN HUMAN LEUKEMIA-LYMPHOMA CELL LINES - 1. CARBOXYLIC ESTERASE. *Leukemia Research* 9, 209–229.

DuBidge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.-M., Miller, J.H., and Calos, M.P. (1987). Analysis of Mutation in Human Cells by Using an Epstein-Barr Virus Shuttle System. *Molecular and Cellular Biology* 7, 379–387.

Edwards, D.R., Handsley, M.M., and Pennington, C.J. (2008). Molecular Aspects of Medicine. *Molecular Aspects of Medicine* 29, 258–289.

Eguchi-Ishimae, M., Eguchi, M., Kempinski, H., and Greaves, M. (2007). NOTCH1 mutation can be an early, prenatal genetic event in T-ALL. *Blood* 111, 376–378.

Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D., and Sklar, J. (1991). TAN-1, the Human Homolog of the Drosophila Notch Gene, Is Broken by Chromosomal Translocations in T Lymphoblastic Neoplasms. *Cell* 66, 649–661.

Endo, Y., Wolf, V., Muraiso, K., Kamijo, K., Soon, L., Uren, A., Barshishat-Kupper, M., and Rubin, J.S. (2004). Wnt-3a-dependent Cell Motility Involves RhoA Activation and Is Specifically Regulated by Dishevelled-2. *Journal of Biological Chemistry* 280, 777–786.

Espinosa, L., Cathelin, S., D'Altri, T., Trimarchi, T., Statnikov, A., Guiu, J., Rodilla, V., Inglés-Esteve, J., Nomdedeu, J., Bellosillo, B., et al. (2010). The Notch/Hes1 Pathway Sustains NF- $\kappa$ B Activation through CYLD Repression in T Cell Leukemia. *Cancer Cell* 18, 268–281.

Esteve, P., and Bovolenta, P. (2010). The Advantages and Disadvantages of Sfrp1 and Sfrp2 Expression in Pathological Events. *Tohoku J. Exp. Med.* 221, 11–17.

Esteve, P., Sandonis, A., Cardozo, M., Malapeira, J., Ibañez, C., Crespo, I., Marcos, S., González-García, S., Toribio, M.L., Arribas, J., et al. (2011a). SFRPs act as negative modulators of ADAM10 to regulate retinal neurogenesis. *Nature Neuroscience* 14, 562–569.



Esteve, P., Sandonis, A., Ibañez, C., Shimon, A., Guerrero, I., and Bovolenta, P. (2011b). Secreted frizzled-related proteins are required for Wnt/ $\beta$ -catenin signalling activation in the vertebrate optic cup. *Development* 138, 4179–4184.

Feyerabend, T.B., Terszowski, G., Tietz, A., Blum, C., Lucie, H., Gossler, A., Gale, N.W., Radtke, F., Fehling, H.J., and Rodewald, H.-R. (2009). Deletion of Notch1 Converts Pro-T Cells to Dendritic Cells and Promotes Thymic B Cells by Cell-Extrinsic and Cell-Intrinsic Mechanisms. *Immunity* 30, 67–79.

Fiorini, E., Merck, E., Wilson, A., Ferrero, I., Jiang, W., Koch, U., Auderset, F., Laurenti, E., Tacchini-Cottier, F., Pierres, M., et al. (2009). Dynamic Regulation of Notch 1 and Notch 2 Surface Expression during T Cell Development and Activation Revealed by Novel Monoclonal Antibodies. *The Journal of Immunology* 183, 7212–7222.

Foss, D.L., Donskoy, E., and Goldschneider, I. (2001). The Importation of Hematogenous Precursors by the Thymus Is a Gated Phenomenon in Normal Adult Mice. *J Exp Med* 193, 365–374.

Fowlkes, B.J., and Robey, E.A. (2002). A reassessment of the effect of activated Notch1 on CD4 and CD8 T cell development. *The Journal of Immunology* 169, 1817–1821.

Garcia-Peydro, M., de Yébenes, V.G., and Toribio, M.L. (2006). Notch1 and IL-7 Receptor Interplay Maintains Proliferation of Human Thymic Progenitors while Suppressing Non-T Cell Fates. *The Journal of Immunology* 177, 3711–3720.

Germar, K., Dose, M., Kontantinou, T., Zhang, J., Wang, H., Lobry, C., Arnett, K.L., Blacklow, S.C., Aifantis, I., Aster, J.C., et al. (2011). T-cell factor 1 is a gatekeeper for T-cell specification in response to Notch signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 20060–20065.

Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A Developmental Pathway Involving Four Phenotypically and Functionally Distinct Subsets of CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Triple-Negative Adult Mouse Thymocytes Defined by CD44 and CD25 Expression. *The Journal of Immunology* 150, 4244–4252.

González-García, S., García-Peydró, M., Martín-Gayo, E., Ballestar, E., Esteller, M., Bornstein, R., la Pompa, de, J.L., Ferrando, A.A., and Toribio, M.L. (2009). CSL–MAML-dependent Notch1 signaling controls T lineage-specific IL-7R $\alpha$  gene expression in early human thymopoiesis and leukemia. *J Exp Med* 206, 779–791.

Gordon, W.R., Roy, M., Vardar-Ulu, D., Garfinkel, M., Mansour, M.R., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2009). Structure of the Notch1-negative regulatory region: implications for normal activation and pathogenic signaling in T-ALL. *Blood* 113, 4381–4390.

Gou, Z., Dose, M., Kovalovsky, D., Chang, R., O'Neil, J., Look, A.T., Boehmer, von, H., Harald, Khazaie, K., and Gounari, F. (2007).  $\beta$ -Catenin stabilization stalls the transition from double-positive to single-positive stage and predisposes thymocytes to malignant transformation. *Blood* 109, 5463–5472.

Gounari, F., Aifantis, I., Khazaie, K., Hoeflinger, S., Harada, N., Taketo, M.M., and Boehmer, von, H. (2001). Somatic activation of  $\beta$ -catenin bypasses pre-TCR signaling and TCR selection in thymocyte development. *Nat Immunol* 2, 863–869.

- Goux, D., Coudert, J.D., Maurice, D., Scarpellino, L., Jeannet, G., Piccolo, S., Weston, K., Huelsken, J., and Held, W. (2005). Cooperating pre-T-cell receptor and TCF-1-dependent signals ensure thymocyte survival. *Blood* 106, 1726–1733.
- Hayward, P., Kalmar, T., and Martinez Arias, A. (2008). Wnt/Notch signalling and information processing during development. *Development* 135, 411–424.
- Henriques, C.M., Rino, J., Nibbs, R.J., Graham, G.J., and Barata, J.T. (2010). IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7R. *Blood* 115, 3269–3277.
- Herranz, D., Ambesi-Impiombato, A., Palomero, T., Schnell, S.A., Belver, L., Wendorff, A.A., Xu, L., Castillo-Martin, M., Llobet-Navás, D., Cordon-Cardo, C., et al. (2014). A NOTCH1-driven MYC enhancer promotes T cell development, transformation and acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 20, 1130–1137.
- Hoang, B., Moos, M., Jr, Vukicevic, S., and Luyten, F.P. (1996). Primary Structure and Tissue Distribution of FRZB, a Novel Protein Related to Drosophila Frizzled, Suggest a Role in Skeletal Morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 271, 26131–26137.
- Hoffman, E.S., Passoni, L., Crompton, T., Leu, T.M.J., Schatz, D.G., Koff, A., Owen, M.J., J, M., and Hayday, A.C. (1996). Productive T-cell receptor  $\beta$ -chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo. *Genes & Development* 10, 948–962.
- Hossain, M.Z., Yu, Q., Xu, M., and Sen, J.M. (2008). ICAT expression disrupts  $\beta$ -catenin-TCF interactions and impairs survival of thymocytes and activated mature T cells. *International Immunology* 20, 925–935.
- Hou, H.-A., Kuo, Y.-Y., Liu, C.-Y., Lee, M.C., Tang, J.-L., Chen, C.-Y., Chou, W.-C., Huang, C.-F., Lee, F.-Y., Liu, M.-C., et al. (2011). Distinct association between aberrant methylation of Wnt inhibitors and genetic alterations in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Cancer* 105, 1927–1933.
- Hozumi, K., Mailhos, C., Negishi, N., Hirano, K.-I., Yahata, T., Ando, K., Zuklys, S., Holländer, G.A., Shima, D.T., and Habu, S. (2008). Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J Exp Med* 205, 2507–2513.
- Hozumi, K., Negishi, N., Suzuki, D., Abe, N., Sotomaru, Y., Tamaoki, N., Mailhos, C., Ish-Horowicz, D., Habu, S., and Owen, M.J. (2004). Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat Immunol* 5, 638–644.
- Ishikawa, F., Yasukawa, M., Lyons, B., Yoshida, S., Miyamoto, T., Yoshimoto, G., Watanabe, T., Akashi, K., Shultz, L.D., and Harada, M. (2005). Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor  $\{\gamma\}$  chain(null) mice. *Blood* 106, 1565–1573.
- Izon, D.J., Punt, J.A., Xu, L., Karnell, F.G., Allman, D., Myung, P.S., Boerth, N.J., Pui, J.C., Koretzky, G.A., and Pear, W.S. (2001). Notch1 Regulates Maturation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Thymocytes by Modulating TCR Signal Strength. *Immunity* 14, 253–264.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R., and Israël, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377, 355–357.

Joshi, I., Minter, L.M., Telfer, J., Demarest, R.M., Capobianco, A.J., Aster, J.C., Sicinski, P., Fauq, A., Golde, T.E., and Osborne, B.A. (2009). Notch signaling mediates G1/S cell-cycle progression in T cells via cyclin D3 and its dependent kinases. *Blood* 113, 1689–1698.

Jost, E., Gezer, D., Wilop, S., Suzuki, H., Herman, J.G., Osieka, R., and Galm, O. (2009). Epigenetic dysregulation of secreted Frizzled-related proteins in multiple myeloma. *Cancer Letters* 281, 24–31.

Kawano, Y., and Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of Cell Science* 116, 2627–2634.

Kleinmann, E., Geimer Le Lay, A.S., Sellars, M., Kastner, P., and Chan, S. (2008). Ikaros Represses the Transcriptional Response to Notch Signaling in T-Cell Development. *Molecular and Cellular Biology* 28, 7465–7475.

Ko, J., Ryu, K.S., Lee, Y.H., Na, D.S., Kim, Y.S., Oh, Y.M., Kim, I.S., and Kim, J.W. (2002). Human Secreted Frizzled-Related Protein Is Down-regulated and Induces Apoptosis in Human Cervical Cancer. *Experimental Cell Research* 280, 280–287.

Koch, U., Fiorini, E., Benedito, R., Besseyrias, V., Schuster-Gossler, K., Pierres, M., Manley, N.R., Duarte, A., MacDonald, H.R., and Radtke, F. (2008). Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J Exp Med* 205, 2515–2523.

Kopan, R., and Ilagan, M.X.G. (2009). The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell* 137, 216–233.

Lee, Y.-S., Lee, K.-A., Yoon, H.-B., Yoo, S.-A., Park, Y.W., Chung, Y., Kim, W.-U., and Kang, C.-Y. (2012). The Wnt inhibitor secreted Frizzled-Related Protein 1 (sFRP1) promotes human Th17 differentiation. *Eur. J. Immunol.* 42, 2564–2573.

Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.-H., Piccolo, S., and De Robertis, E.M. (1997). Frzb-1 Is a Secreted Antagonist of Wnt Signaling Expressed in the Spemann Organizer. *Cell* 88, 747–756.

Li, X., Gounari, F., Protopopov, A., Khazaie, K., and Boehmer, von, H. (2008). Oncogenesis of T-ALL and nonmalignant consequences of overexpressing intracellular NOTCH1. *J Exp Med* 205, 2851–2861.

Liang, H., Chen, Q., Coles, A.H., Anderson, S.J., Pihan, G., Bradley, A., Gerstein, R., Jurecic, R., and Jones, S.N. (2003). Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell* 4, 349–360.

Liang, H., Coles, A.H., Zhu, Z., Zayas, J., Jurecic, R., Kang, J., and Jones, S.N. (2007). Noncanonical Wnt signaling promotes apoptosis in thymocyte development. *J Exp Med* 204, 3077–3084.

Lin, K., Wang, S., Julius, M.A., Kitajewski, J., Moos, M., Jr, and Luten, F.P. (1997). The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 11196–11200.

Lin, Y.-W., Nichols, R.A., Letterio, J.J., and Aplan, P.D. (2006). Notch1 mutations are important for leukemic transformation in murine models of precursor-T

leukemia/lymphoma. *Blood* 107, 2540–2543.

Liu, T.-H. (2006). CpG Island Methylation and Expression of the Secreted Frizzled-Related Protein Gene Family in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Research* 66, 653–658.

Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781–810.

MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/β-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell* 17, 9–26.

MacDonald, H.R., Budd, R.C., and Howe, R.C. (1998). A CD3<sup>−</sup> subset of CD4<sup>+</sup> thymocytes: a rapidly

cycling intermediate in the generation of CD4<sup>+</sup> cells. *The Journal of Immunology* 158, 519–523.

Maillard, I., Tu, L., Sambandam, A., Yashiro-Ohtani, Y., Millholland, J., Keeshan, K., Shestova, O., Xu, L., Bhandoola, A., and Pear, W.S. (2006). The requirement for Notch signaling at the beta-selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor. *J Exp Med* 203, 2239–2245.

Malecki, M.J., Sanchez-Irizarry, C., Mitchell, J.L., Histen, G., Xu, M.L., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2006). Leukemia-Associated Mutations within the NOTCH1 Heterodimerization Domain Fall into at Least Two Distinct Mechanistic Classes. *Molecular and Cellular Biology* 26, 4642–4651.

Manesso, E., Chickarmane, V., Kueh, H.Y., Rothenberg, E.V., and Peterson, C. (2013). Computational modelling of T-cell formation kinetics: output regulated by initial proliferation-linked deferral of developmental competence. *Journal of the Royal Society Interface* 10, 20120774–20120774.

Matsuda, Y., Schlange, T., Oakeley, E.J., Boulay, A., and Hynes, N.E. (2009). WNT signaling enhances breast cancer cell motility and blockade of the WNT pathway by sFRP1 suppresses MDA-MB-231 xenograft growth. *Breast Cancer Research* 11, 1–16.

Mazzucchelli, R., and Durum, S.K. (2007). Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol* 7, 144–154.

Mii, Y., and Taira, M. (2011). Secreted Wnt “inhibitors” are not just inhibitors: Regulation of extracellular Wnt by secreted Frizzled-related proteins. *Development, Growth & Differentiation* 53, 911–923.

Moore, N.C., Anderson, G., Smith, C.A., Owen, J.J.T., and Jenkinson, E.J. (1993). Analysis of cytokine gene expression in subpopulations of freshly isolated thymocytes and thymic stromal cells using semiquantitative polymerase chain reaction. *Eur. J. Immunol.* 23, 922–927.

Morikawa, S., Tatsumi, E., Baba, M., Harada, T., and Yasuhira, K. (1978). TWO E-ROSETTE-FORMING LYMPHOID CELL LINES. *Int. J. Cancer* 21, 166–170.

Mulroy, T. (2003). β-Catenin expression enhances generation of mature thymocytes. *International Immunology* 15, 1485–1494.

Mulroy, T., McMahon, J.A., Burakoff, S.J., McMahon, A.P., and Sen, J. (2002). Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur. J. Immunol.* 32, 967–971.

Munitic, I., Williams, J.A., Yang, Y., Dong, B., Lucas, P.J., Kassar, El, N., Gress, R.E., and Ashwell, J.D. (2004). Dynamic regulation of IL-7 receptor expression is required for normal thymopoiesis. *Blood* 104, 4165–4172.

Murphy, G. (2008). The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 8, 932–941.

Nakajima, H., Ito, M., Morikawa, Y., Komori, T., Fukuchi, Y., Shibata, F., Okamoto, S., and Kitamura, T. (2009). Wnt modulators, SFRP-1, and SFRP-2 are expressed in osteoblasts and differentially regulate hematopoietic stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390, 65–70.

Oberg, C., Li, J., Pauley, A., Wolf, E., Gurney, M., and Lendahl, U. (2001). The Notch Intracellular Domain Is Ubiquitinated and Negatively Regulated by the Mammalian Sel-10 Homolog. *Journal of Biological Chemistry* 276, 35847–35853.

Okamura, R.M., Sigvardsson, M., Galceran, J., Verbeek, S., Clevers, H., and Grosschedl, R. (1998). Redundant Regulation of T Cell Differentiation and TCR $\alpha$  Gene Expression by the Transcription Factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity* 8, 11–20.

Oldefest, M., Düsterhöft, S., Desel, C., Thyssen, S., Fink, C., Rabe, B., Lories, R., Grötzinger, J., and Lorenzen, I. (2015a). Secreted Frizzled-related protein 3 (sFRP3)-mediated suppression of interleukin-6 receptor release by A disintegrin and metalloprotease 17 (ADAM17) is abrogated in the osteoarthritis-associated rare double variant of sFRP3. *Biochem. J.* 468, 507–518.

Oldefest, M., Düsterhöft, S., Desel, C., Thyssen, S., Fink, C., Rabe, B., Lories, R., Grötzinger, J., and Lorenzen, I. (2015b). Secreted Frizzled-related protein 3 (sFRP3)-mediated suppression of interleukin-6 receptor release by A disintegrin and metalloprotease 17 (ADAM17) is abrogated in the osteoarthritis-associated rare double variant of sFRP3. *Biochem. J.* 468, 507–518.

Palomero, T., and Ferrando, A. (2008). Oncogenic NOTCH1 Control of MYC and PI3K: Challenges and Opportunities for Anti-NOTCH1 Therapy in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemias and Lymphomas. *Clinical Cancer Research* 14, 5314–5317.

Palomero, T., Barnes, K.C., Real, P.J., Glade Bender, J.L., Sulis, M.L., Murty, V.V., Colovai, A.I., Balbin, M., and Ferrando, A.A. (2006a). CUTLL1, a novel human T-cell lymphoma cell line with t(7;9) rearrangement, aberrant NOTCH1 activation and high sensitivity to  $\gamma$ -secretase inhibitors. *Leukemia* 20, 1279–1287.

Palomero, T., McKenna, K., O'Neil, J., Galinsky, I., Stone, R., Suzukawa, K., Stiakaki, E., Kalmanti, M., Fox, E.A., Caligiuri, M.A., et al. (2006b). Activating mutations in NOTCH1 in acute myeloid leukemia and lineage switch leukemias. *Leukemia* 20, 1963–1966.

Palomero, T., Lim, W.K., Odom, D.T., Sulis, M.L., Real, P.J., Margolin, A., Barnes, K.C., O'Neil, J., Neuberg, D., Weng, A.P., et al. (2006c). NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 18261–18266.

- Park, J.-H., Yu, Q., Erman, B., Appelbaum, J.S., Montoya-Durango, D., Grimes, H.L., and Singer, A. (2004). Suppression of IL7R $\alpha$  Transcription by IL-7 and Other Prosurvival Cytokines. *Immunity* 21, 289–302.
- Passoni, L., Hoffman, E.S., Kim, S., Crompton, T.L., Pao, W., Dong, M.-Q., Owen, M.J., and Hayday, A.C. (1997). Intrathymic  $\delta$  Selection Events in  $\gamma\delta$  Cell Development. *Immunity* 7, 83–85.
- Pear, W.S., Aster, J.C., Scott, M.L., Hasserjian, R.P., Soffer, B., Sklar, J., and Baltimore, D. (1996). Exclusive Development of T Cell Neoplasms in Mice Transplanted with Bone Marrow Expressing Activated Notch Alleles. *183*, 2283–2291.
- Peschon, J.J., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Ramsdell, F.J., Maraskovsky, E., Gliniak, B.C., Park, L.S., Ziegler, S.F., Williams, D.E., Ware, C.B., et al. (1994). Early Lymphocyte Expansion Is Severely Impaired in Interleukin 7 Receptor-deficient Mice. *J Exp Med* 180, 1955–1960.
- Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., et al. (1998). An Essential Role for Ectodomain Shedding in Mammalian Development. *Science* 282, 1281–1284.
- Plum, J., De Smedt, M., Leclercq, G., Verhasselt, B., and Vandekerckhove, B. (1996). Interleukin-7 Is a Critical Growth Factor in Early Human T-cell Development. *Blood* 88, 4239–4245.
- Pongracz, J.E., Parnell, S.M., Jones, T., Anderson, G., and Jenkinson, E.J. (2006). Overexpression of ICAT highlights a role for catenin-mediated canonical Wnt signalling in early T cell development. *Eur. J. Immunol.* 36, 2376–2383.
- Porritt, H.E., Rumpfelt, L.L., Tabrizifard, S., Schmitt, T.M., Zúñiga-Pflücker, J.C., and Petrie, H.T. (2004). Heterogeneity among DN1 Prothymocytes Reveals Multiple Progenitors with Different Capacities to Generate T Cell and Non-T Cell Lineages. *Immunity* 20, 735–745.
- Pui, C.-H., Robison, L.L., and Look, A.T. (2008). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* 371, 1030–1043.
- Pui, J.C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Lee, J.Y., Kadesch, T., Hardy, R.R., Aster, J.C., et al. (1999). Notch1 Expression in Early Lymphopoiesis Influences B versus T Lineage Determination. *Immunity* 11, 299–308.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., and Aguet, M. (1999). Deficient T Cell Fate Specification in Mice with an Induced Inactivation of *Notch1*. *Immunity* 10, 547–588.
- Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., Aster, J.C., Krishna, S., Metzger, D., Chambon, P., et al. (2001). Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO Journal* 20, 3427–3436.
- Reizis, B., and Leder, P. (2002). Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. *Genes & Development* 16, 295–300.



Renström, J., Istvanffy, R., Gauthier, K., Shimono, A., Mages, J., Jardon-Alvarez, A., Kröger, M., Schiemann, M., Busch, D.H., Esposito, I., et al. (2009). Secreted Frizzled-Related Protein 1 Extrinsically Regulates Cycling Activity and Maintenance of Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell* 5, 157–167.

Robey, E.A., Chang, D., Itano, A., Cado, D., Alexander, H., Ians, D., Weinmaster, G., and Salmon, P. (1996). An Activated Form of Notch Influences the Choice between CD4 and CD8 T Cell Lineages. *Cell* 87, 483–492.

Ronchini, C., and Capobianco, A.J. (2001). Induction of Cyclin D1 Transcription and CDK2 Activity by Notch: Implication for Cell Cycle Disruption in Transformation by Notch. *Molecular and Cellular Biology* 21, 5925–5934.

Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Wetering, M., Destree, O., and Clevers, H. (1998). The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 395, 608–612.

Rothenberg, E.V. (2007). Negotiation of the T lineage fate decision by transcription-factor interplay and microenvironmental signals. *Immunity* 26, 690–702.

Sambandam, A., Maillard, I., Zediak, V.P., Xu, L., Gerstein, R.M., Aster, J.C., Pear, W.S., and Bhandoola, A. (2005). Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat Immunol* 6, 663–670.

Sanchez-Martin, M., Ambesi-Impiombato, A., Qin, Y., Herranz, D., Bansal, M., Girardi, T., Paietta, E., Tallman, M.S., Rowe, J.M., De Keersmaecker, K., et al. (2017). Synergistic antileukemic therapies in NOTCH1-induced T-ALL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 2006–2011.

Satoh, W., Gotoh, T., Tsunematsu, Y., Aizawa, S., and Shimono, A. (2006). *Sfrp1* and *Sfrp2* regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis. *Development* 133, 989–999.

Schmitt, T.M., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2002). Induction of T Cell Development from Hematopoietic Progenitor Cells by Delta-like-1 In Vitro. *Immunity* 17, 749–756.

Schmitt, T.M., Ciofani, M., Petrie, H.T., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2004). Maintenance of T Cell Specification and Differentiation Requires Recurrent Notch Receptor–Ligand Interactions. *J Exp Med* 200, 469–479.

Schneider, U., Schwenk, H.-U., and Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* 19, 621–626.

Shen, J.-Z., Xu, C.-B., Fu, H.-Y., Wu, D.-S., Zhou, H.-R., and Fan, L.-P. (2011). Methylation of Secreted Frizzled Related Protein Gene in Acute Leukemia Patients in China. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 12, 2617–2621.

Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G., and Scollay, R. (1990). The generation and fate of thymocytes. *Seminars in Immunology* 2, 3–12.

Smith, S.D., Morgan, R., Link, M.P., McFall, P., and Hecht, F. (1986). Cytogenetic and immunophenotypic analysis of cell lines established from patients with T cell leukemia/lymphoma. *Blood* 67, 650–656.

- Staal, F.J.T., Meeldijk, J., Moerer, P., Jay, P., van de Weerd, B.C.M., Vainio, S., Nolan, G.P., and Clevers, H. (2001). Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription. *Eur. J. Immunol.* *31*, 285–293.
- Sulis, M.L., Saftig, P., and Ferrando, A.A. (2011). Redundancy and specificity of the metalloprotease system mediating oncogenic NOTCH1 activation in T-ALL. *Leukemia* *25*, 1564–1569.
- Taghon, T., Yui, M.A., Pant, R., Diamond, R.A., and Rothenberg, E.V. (2006). Developmental and Molecular Characterization of Emerging  $\beta$ - and  $\gamma\delta$ -Selected Pre-T Cells in the Adult Mouse Thymus. *Immunity* *24*, 53–64.
- Tan, J.B., Visan, I., Yuan, J.S., and Guidos, C.J. (2005). Requirement for Notch1 signals at sequential early stages of intrathymic T cell development. *Nat Immunol* *6*, 671–679.
- Tanigaki, K., Tsuji, M., Yamamoto, N., Han, H., Tsukada, J., Inoue, H., Kubo, M., and Honjo, T. (2004). Regulation of  $\alpha\beta/\gamma\delta$  T Cell Lineage Commitment and Peripheral T Cell Responses by Notch/RBP-J Signaling. *Immunity* *20*, 611–622.
- Tatarek, J., Cullion, K., Ashworth, T., Gerstein, R., Aster, J.C., and Kelliher, M.A. (2011). Notch1 inhibition targets the leukemia-initiating cells in a Tal1/Lmo2 mouse model of T-ALL. *Blood* *118*, 1579–1590.
- Tian, L., Wu, X., Chi, C., Han, M., Xu, T., and Zhuang, Y. (2008). ADAM10 is essential for proteolytic activation of Notch during thymocyte development. *International Immunology* *20*, 1181–1187.
- To, K.F., Chan, M.W., Leung, W.K., Yu, J., Tong, J.H.M., Lee, T.L., Chan, F.K.L., and Sung, J.J.Y. (2001). Alterations of frizzled (FzE3) and secreted frizzled related protein (hsFRP) expression in gastric cancer. *Life Science* *70*, 483–489.
- Trevant, B., Gaur, T., Hussain, S., Symons, J., Komm, B.S., Bodine, P.V.N., Stein, G.S., and Lian, J.B. (2008). Expression of secreted frizzled related protein 1, a Wnt antagonist, in brain, kidney, and skeleton is dispensable for normal embryonic development. *J. Cell. Physiol.* *217*, 113–126.
- Tu, L., Fang, T.C., Artis, D., Shestova, O., Pross, S.E., Maillard, I., and Pear, W.S. (2005). Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *J Exp Med* *202*, 1037–1042.
- Turashvili, G., Bouchal, J., Burkadze, G., and Kolar, Z. (2006). Wnt Signaling Pathway in Mammary Gland Development and Carcinogenesis. *Pathobiology* *73*, 213–223.
- Uckun, F.M., Sather, H.N., Gaynon, P.S., Arthur, D.C., Trigg, M.E., Tubergen, D.G., Nachman, J., Steinherz, P.G., Sensel, M.G., and Reaman, G.H. (1997). Clinical Features and Treatment Outcome of Children With Myeloid Antigen Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From the Children's Cancer Group. *Blood* *90*, 28–35.
- Üren, A., Reichsman, F., Anest, V., Taylor, W.G., Muraiso, K., Bottaro, D.P., Cumberledge, S., and Rubin, J.S. (2000). Secreted Frizzled-related Protein-1 Binds Directly to Wingless and Is a Biphasic Modulator of Wnt Signaling. *The Journal of Biological Chemistry* *275*, 4374–4382.
- Vaillant, F., Blyth, K., Andrew, L., Neil, J.C., and Cameron, E.R. (2002). Enforced



Expression of Runx2 Perturbs T Cell Development at a Stage Coincident with Enforced Expression of Runx2 Perturbs T Cell Development at a Stage Coincident with  $\beta$ -Selection. *The Journal of Immunology* 2866–2874.

van Tetering, G., van Diest, P., Verlaan, I., van der Wall, E., Kopan, R., and Vooijs, M. (2009). Metalloprotease ADAM10 Is Required for Notch1 Site 2 Cleavage. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 31018–33027.

Vincent, K.M., and Postovit, L.-M. (2017). A pan-cancer analysis of secreted Frizzled-related proteins: re-examining their proposed tumour suppressive function. *Nature Publishing Group* 1–9.

Wada, H., Masuda, K., Satoh, R., Kakugawa, K., Ikawa, T., Katsura, Y., and Kawamoto, H. (2008). Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature* 452, 768–772.

Wang, H., Zang, C., Taing, L., Arnett, K.L., Wong, Y.J., Pear, W.S., Blacklow, S.C., Liu, X.S., and Aster, J.C. (2014). NOTCH1–RBPJ complexes drive target gene expression through dynamic interactions with superenhancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 705–710.

Wang, H., Zou, J., Zhao, B., Johannsen, E., Ashworth, T., Wong, H., Pear, W.S., Schug, J., Blacklow, S.C., Arnett, K.L., et al. (2011). Genome-wide analysis reveals conserved and divergent features of Notch1/RBPJ binding in human and murine T-lymphoblastic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 14908–14913.

Wang, H.-Y., Liu, T., and Malbon, C.C. (2006). Structure-function analysis of Frizzleds. *Cellular Signalling* 18, 934–941.

Wang, S., Krinks, M., Lin, K., Luyten, F.P., and Moos, M. (1997). Frzb, a Secreted Protein Expressed in the Spemann Organizer, Binds and Inhibits Wnt-8. *Cell* 88, 757–766.

Weber, B.N., Chi, A.W.-S., Chavez, A., Yashiro-Ohtani, Y., Yang, Q., Shestova, O., and Bhandoola, A. (2012). A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation. *Nature* 476, 63–68.

Weerkamp, F., van Dongen, J.J.M., and Staal, F.J.T. (2006a). Notch and Wnt signaling in T-lymphocyte development and acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 20, 1197–1205.

Weerkamp, F., Baert, M.R.M., Naber, B.A.E., Koster, E.E.L., de Haas, E.F.E., Atkuri, K.R., van Dongen, J.J.M., Herzenberg, L.A., and Staal, F.J.T. (2006b). Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 322–3326.

Weijer, K., Uittenbogaart, C.H., Voordouw, A., Couwenberg, F., Seppen, J., Blom, B., Vyth-Dreese, F.A., and Spits, H. (2002). Intrathymic and extrathymic development of human plasmacytoid dendritic cell precursors in vivo. *Blood* 99, 2752–2759.

Wendorff, A.A., Koch, U., Wunderlich, F.T., Wirth, S., Dubey, C., Brüning, J.C., MacDonald, H.R., and Radtke, F. (2010). Hes1 Is a Critical but Context-Dependent Mediator of Canonical Notch Signaling in Lymphocyte Development and Transformation. *Immunity* 33, 671–684.

- Weng, A.P. (2004). Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science* 306, 269–271.
- Weng, A.P., Nam, Y., Wolfe, M.S., Pear, W.S., Griffin, J.D., Blacklow, S.C., and Aster, J.C. (2003). Growth Suppression of Pre-T Acute Lymphoblastic Leukemia Cells by Inhibition of Notch Signaling. *Molecular and Cellular Biology* 23, 655–664.
- Weng, A.P., Millholland, J.M., Yashiro-Ohtani, Y., Arcangeli, M.L., Lau, A., Wai, C., del Bianco, C., Rodriguez, C.G., Sai, H., Tobias, J., et al. (2006). c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes & Development* 20, 2096–2109.
- Wiles, M.V., Ruiz, P., and Imhof, B.A. (1992). Interleukin-7 expression during mouse thymus development. *Eur. J. Immunol.* 22, 1037–1042.
- Wilson, A., MacDonald, H.R., and Radtke, F. (2001). Notch 1–deficient Common Lymphoid Precursors Adopt a B Cell Fate in the Thymus. *J Exp Med* 194, 1003–1012.
- Wolfer, A., Bakker, T., Wilson, A., Nicolas, M., Ioannidis, V., Littman, D.R., Wilson, C.B., Held, W., MacDonald, H.R., and Radtke, F. (2001). Inactivation of Notch1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8 T cell development. *Nat Immunol* 2, 235–241.
- Wolfer, A., Wilson, A., Nemir, M., MacDonald, H.R., and Radtke, F. (2002). Inactivation of Notch1 Impairs VDJ $\beta$  Rearrangement and Allows pre-TCR-Independent Survival of Early  $\alpha\beta$  Lineage Thymocytes. *Immunity* 16, 869–879.
- Wright, D.E., Wagers, A.J., Gulati, A.P., Johnson, F.L., and Weissman, I.L. (2001). Physiological Migration of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Science* 294, 1933–1936.
- Wu, Y., Cain-Hom, C., Choy, L., Hagenbeek, T.J., de Leon, G.P., Chen, Y., Finkle, D., Venook, R., Wu, X., Ridgway, J., et al. (2010). Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature* 464, 1052–1057.
- Xiao, S.Y., Li, Y., and Chen, W.F. (2003). Kinetics of thymocyte developmental process in fetal and neonatal mice. *Cell Research* 13, 265–273.
- Xie, H., Huang, Z., Sadim, M.S., and Sun, Z. (2005). Stabilized  $\beta$ -Catenin Extends Thymocyte Survival by Up-Regulating Bcl-xL. *The Journal of Immunology* 175, 7981–7988.
- Xu, Y., Banerjee, D., Huelsken, J., Birchmeier, W., and Sen, J.M. (2003). Deletion of  $\beta$ -catenin impairs T cell development. *Nat Immunol* 4, 1177–1182.
- Yashiro-Ohtani, Y., He, Y., Ohtani, T., Jones, M.E., Shestova, O., Xu, L., Fang, T.C., Chiang, M.Y., Intlekofer, A.M., Blacklow, S.C., et al. (2009). Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A. *Genes & Development* 23, 1665–1676.
- Yashiro-Ohtani, Y., Wang, H., Zang, C., Arnett, K.L., Bailis, W., Ho, Y., Knoechel, B., Lanauze, C., Louis, L., Forsyth, K.S., et al. (2014). Long-range enhancer activity determines Mycsensitivity to Notch inhibitors in T cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, E4946–E4953.

- Yu, Q., and Sen, J.M. (2007).  $\beta$ -Catenin Regulates Positive Selection of Thymocytes but Not Lineage Commitment. *The Journal of Immunology* *178*, 5028–5034.
- Yu, Q., Erman, B., Park, J.-H., Feigenbaum, L., and Singer, A. (2004). IL-7 Receptor Signals Inhibit Expression of Transcription Factors TCF-1, LEF-1, and ROR $\gamma$ t. *J Exp Med* *200*, 797–803.
- Yu, Q., Park, J.-H., Doan, L.L., Erman, B., Feigenbaum, L., and Singer, A. (2006). Cytokine signal transduction is suppressed in preselection double-positive thymocytes and restored by positive selection. *J Exp Med* *203*, 165–175.
- Yu, Q., Xu, M., and Sen, J.M. (2007).  $\beta$ -Catenin Expression Enhances IL-7 Receptor Signaling in Thymocytes during Positive Selection. *The Journal of Immunology* *179*, 126–131.
- Zhan, T., Rindtorff, N., and Boutros, M. (2016). Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 1–13.
- Zhou, Z., Wang, J., Han, X., Zhou, J., and Linder, S. (1998). Up-Regulation of Human Secreted Frizzled Homolog in Apoptosis and Its Down-Regulation in Breast Tumors. *Int. J. Cancer* *78*, 95–99.
- Zou, W., and Restifo, N.P. (2010). TH17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature Publishing Group* *10*, 248–256.